

Ústav biochemie PŘF MU

Mgr. studium Bioanalytik – odborný pracovník v laboratorních metodách

Klinická biochemie – cvičení, rok 2023/2024

Praktické cvičení č. datum: Jméno:

Otázky:

1. Jaké fenotypy haptoglobinu se vyskytují v lidské populaci a jakými vlastnostmi se liší?
2. Můžete určit fenotyp haptoglobinu z klasické elektroforézy bílkovin lidského séra v agarózovém gelu? Ve které frakci haptoglobin migruje?
3. Jaké je dnes hlavní klinické použití elektroforézy bílkovin lidského séra?
4. Co je to monoklonální komponenta?
5. Jak převedete výsledky elektroforézy bílkovin séra v procentech z celkového signálu gelu na koncentrační vyjádření v g/L?

Téma:

1. Stanovení fenotypu haptoglobinu pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu

Přístroje a pomůcky:

Elektroforetická aparatura Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad), stojánky, zkumavky, pipety, špičky, kádinky, předvážky, míchačka

7,5% PAGE gely Mini Protean (BioRad), Tris-Pufr, methanol, vzorkový pufr (Bio-Rad), hemoglobin pro přípravu vzorků, destilovaná voda

Úkoly:

1. Připravit pracovní pufr – připravte 1 L pracovního pufru:
 - 100 mL Tris pufru (Bio-Rad)
 - 200 mL methanolu
 - 700 mL destilované vody
2. Připravit vzorky: do označených eppendorfek napipetujte:
 - 7 μ L vzorku (plazma, sérum)
 - 5 μ L hemoglobinu
 - 24 μ L vzorkového pufru

Promíchat před nanášením pipetou – nanést 30 μ L vzorku na jamku.

3. Příprava gelu a sestavení elektroforetické aparatury Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell:
 - Po vyjmutí gelu z obalu je nutné odstranit proužek ze spodní části gelu a opatrně částečně vytáhnout hřebínek v horní části gelu
 - Umístěte polyakrylamidový gel do držáku
 - Vložte držák s gely do elektroforetické vany

- Naplňte elektroforetickou vanu po rysku připraveným pufrem
- Vytáhněte hřebínek v horní části gelu
- Napipetujte připravené promíchané vzorky do jamek gelu – nanést 30 µL vzorku na jamku
- Umístěte víko elektroforetické aparatury a připojte zdroj
- Nastavte zdroj na 150 V a spusťte elektroforetické dělení – „RUN“
- Doba dělení asi 1,5 h

VIZ <https://youtu.be/XnEdmk1Sgvg>

- Připravte vizualizační roztok – celkem 500 mL:
 - Na předvážkách navážit 250 mg diaminobenzidinu
 - Rozpustit v kádince na míchačce v 300 mL fosfátového pufru
 - Po rozpuštění přelít do odměrné baňky a doplnit do 500 mL
 - Nalijte do nádoby pro vizualizaci gelu
 - Těsně před použitím přidat 1,2 mL 30% peroxidu vodíku
- Po ukončení elektroforetického dělení:
 - Vypněte a odpojte zdroj
 - Sundejte víko
 - Vyjměte držák s gely z elektroforetické vany
 - Pomocí skalpelu odstraňte kryt gelu a gel ponořte do nádoby s vizualizačním roztokem
 - Vizualizace probíhá asi 20-30 minut, poté gel opatrně vyjměte a položte na připravenou skleněnou desku
- Určete typ fenotypu haptoglobinu pro jednotlivé vzorky

Vzorek číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fenotyp haptoglobinu										

2. Elektroforéza bílkovin séra (moče)

Princip: metoda slouží k rozdělení a kvantifikaci šesti hlavních frakcí (albumin, alfa1, alfa2, beta1, beta2 a gama frakce) proteinů lidského séra pomocí elektroforézy na agarózovém gelu v prostředí alkalického pufru (pH 8,5).

Viz přiložený originální návod výrobce (14101_cz)!

Reagencie: Souprava Hydragel 30 β1-β2 (výrobce Sebia):

- Agarosový gel, připraven k použití
- Kontaktní proužky, pufrované, připraveny k použití
- Aplikátory vzorků
- Filtrační papíry

Pracovní postup:

- Migrace:
 - Zapněte Hydrasys

- Vyberte program: č. 4 15/30 PROTEIN(E) β 1- β 2
 - Vybalte aplikátory (hřebeny) z krabičky
 - Položte aplikátory na plochu pracovního stolu čísly (jamkami) směrem k sobě
 - Aplikujte 10 μ L séra do každé jamky
 - Po aplikaci posledního vzorku vložte aplikátor zuby směrem nahoru do vlhké komůrky, kde nechte séra dále difundovat do aplikátoru ještě 5 minut (po nanesení posledního vzorku)
 - Otevřete víko migrační komory a zvedněte nosič elektrod a aplikátorů
 - Vybalte gel
 - Krátce odsajte přebytek roztoku z povrchu gelu tenkým filtračním papírem
 - Aplikujte 200 μ L destilované vody na migrační destičku, na přední část předtištěného rámečku
 - Umístěte gel na desku do prostoru předtištěného rámečku
 - Ujistěte se, že pod gelem nezůstaly žádné vzduchové bubliny!
 - Vybalte houbičky nasycené puřem z balení a umístěte je plastickými konci na kovové trny do aplikačního rámečku
 - Sklopte aplikační rámeček do dolní pozice
 - Vyjměte aplikátor z vlhké komůrky a odstraňte z něj ochranný rámeček ze strany zubů
 - Umístěte aplikátory do pozice 3 a 9 v aplikačním rámečku (čísla vytištěná, vyražená na aplikátoru vzorků musí vždy směřovat k obsluze)
 - Uzavřete kryt migrační komory HYDRASYSU
 - Zavřete víko migračního modulu, zkontrolujte, že máte nastavený program č. 4 15/30 PROTEIN(E) β 1- β 2 a zapněte START
2. BARVENÍ: Když je gel připraven pro barvení, vyjměte jej z migrační komory a vložte jej do nosiče gelu:
- Otevřete nosič gelu
 - Položte jej na desku stolu
 - Umístěte gel do drážek vyfrézovaných v nosiči gelů, tak aby citlivá strana gelu směřovala k vám
 - Uzavřete nosič gelu a ujistěte se, že gel je správně uchycen
 - Vložte nosič gelu s gelem do barvicí komory
 - Vyberte barvicí program (staining program) č. 1 PROTEIN(E) β 1- β 2
 - Po ukončení barvicí procedury vyjměte usušený gel z barvicí komory
3. VYHODNOCENÍ ELEKTROFOREOGRAMU
- Elektroforeogram naskenujte
 - Proveďte vyhodnocení jednotlivých frakcí pomocí programu PHORESIS u prvních pěti vzorků

Vzorek č.	1	2	3	4	5
Albumin %					
Alfa1- globuliny %					
Alfa2-globuliny %					
Beta1-globuliny %					
Beta2-globuliny %					
Gama-globuliny %					
M-komponenta (+ přítomna/- nepřítomna; %)					