|  |
| --- |
| **jméno:** |
| **obor:** | **datum provedení:** |
| **neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu**a b c d e f g h (zakroužkujte) |

přílohy protokolu: 3x graf: kalibrační přímka pro stanovení bílkovin fotometricky v UV oblasti, kalibrační přímka pro stanovení bílkovin biuretovou metodou, kalibrační přímka pro stanovení bílkovin Folinovou metodou.

**OKRUHY K PŘÍPRAVĚ**

Absorbující složky bílkovin. Absorpční spektrum bílkovin. Principy metod stanovení bílkovin. Lambertův-Beerův zákon. Stechiometrie neutralizačních titrací. Chemické výpočty.

**Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).**

**Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen části C, D.**

**Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): jen části A, C, D.**

**PRINCIP ÚLOHY**

**A. Spektrofotometrické stanovení bílkovin v UV oblasti**

Aromatická jádra aminokyselin tyrosinu a tryptofanu, které jsou obsaženy v bílkovinách, silně absorbují UV záření s absorpčním maximem v oblasti vlnových délek 275 až 290 nm, fenylalanin absorbuje slaběji s maximem v okolí vlnové délky 260 nm. (Silnou absorpci v okolí vlnové délky 260 nm vykazují nukleové kyseliny.) **Celková koncentrace bílkovin** ve vzorku se proto velmi často stanovuje **spektrofotometricky** na základě absorpce při vlnové délce **280 nm**, je-li k dispozici vhodný standardní vzorek.

**B. Stanovení hmotnostního zlomku tyrosinu a tryptofanu v bílkovině**

Schopnost jednotlivých bílkovin absorbovat UV záření se velmi liší v závislosti na obsahu tyrosinu a tryptofanu, absorpční koeficient se u různých bílkovin může lišit až desetinásobně. Podíl tyrosinu a tryptofanu v bílkovině lze určit změřením absorbance vzorku se známou koncentrací bílkoviny při dvou vlnových délkách v UV oblasti (vlnová délka absorpčního maxima /280 nm/ a vlnová délka bodu, kde se absorpční spektra obou aminokyselin protínají /294 nm/) v alkalickém prostředí).

Absorpci bílkovin lze měřit i při kratších vlnových délkách (např. **235 nm**), kde UV světlo silně absorbují kromě tryptofanových a tyrosinových zbytků také postranné řetězce fenylalaninu, histidinu, methioninu a cysteinu a rovněž peptidové vazby. Absorpce bílkovin při velmi krátkých (kolem 200 nm) vlnových délkách je méně závislá na jejich aminokyselinovém složení, zejména při **205** nm absorbují velmi silně peptidové vazby. K dispozici je však nutné mít velmi čisté vzorky (**v této oblasti spektra absorbuje mnoho různých látek** včetně nečistot v destilované vodě).

**C. Stanovení bílkovin Folinovou metodou**

Metoda je založena na oxidaci postranního řetězce **tyrosinu** v molekulách bílkovin fosfomolybdenanem a fosfowolframanem za vzniku barevných produktů (sloučenin pětimocného molybdenu a wolframu) s absorpčním maximem při vlnové délce **745 nm**, jejichž koncentraci lze stanovit fotometricky. Je citlivější než biuretová metoda a lze ji využít pro analýzu vzorků obsahujících řádově desetiny miligramu proteinu v ml.

Metoda byla k různým účelům dále modifikována (podle **Lowryho**, podle Hartree a Lowryho), tyto modifikace se vyznačují ještě vyšší citlivostí a dodávají se komerčně v setech pro rutinní stanovení ve výzkumu i praxi.

**D.** **Stanovení koncentrace proteinů bicinchoninovou metodou**

Poprvé byla metoda popsána P. K. Smithem v roce 1985. Metoda je založena na podobném principu jako **Lowryho metoda** s tím rozdílem, že Cu+ ionty, které se tvoří v alkalickém prostředí jako redukční produkt vlivem přítomnosti tyrosinových a tryptofanových zbytků v molekulách bílkovin, se detekují **kyselinou bicinchoninovou (BCA)**, s kterou tvoří barevný komplex s absorpčním maximem při 562 nm. Výhodou metody je obecně vyšší tolerance ke sloučeninám, které interferují v Lowryho metodě, a současně je jen málo citlivá k detergentům a denaturačním činidlům (močovina, guanidin).

**PRAKTICKÁ ČÁST A. Spektrofotometrické stanovení bílkovin v UV oblasti**

**Materiál a vybavení:**

2,5 mmol.l-1 roztok fenylalaninu (**Phe**), 0,25 mmol.l-1 roztok tyrosinu (**Tyr**), 0,1 mmol.l-1 roztok tryptofanu (**Trp**)

standardní roztok bílkoviny - hovězí sérový albumin (**BSA**) (2,5 mg.ml-1)

**neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu (obsahuje BSA o neznámé koncentraci)**

hovězí krevní sérum (**KS**)

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

*zkumavky, pipety,dávkovače, odměrné baňky 10 ml a 50 ml, vortex, fotometr, UV-propustné kyvety*

Postup:

***Fotometrické stanovení bílkovin v UV oblasti.*** Standardní roztok BSA (2,5 mg.ml-1) zřeďte tak, že 4 ml standardního roztoku BSA doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promícháte. Stejným způsobem zřeďte vzorek BSA o neznámé koncentraci. Vzorek krevního séra zřeďte tak, že 0,25 ml KS doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 50 ml a dobře promícháte. Podle tabulky připravte jednak sadu roztoků vzorků o šesti známých koncentracích BSA k sestrojení kalibrační závislosti (zkumavky 1-6), dále 2 paralelní zkumavky se zředěným roztokem BSA o neznámé koncentraci (zkumavky 7-8) a 2 zkumavky ze zředěným roztokem KS (zkumavky 9-10). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok - nulová koncentrace bílkoviny) použijete později jako slepý vzorek.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| zkumavkač. | pipetovaný objem | vypočtenác(BSA) [mg.ml-1] | A280 |
| zředěný standardní roztok BSA [ml] | zředěný neznámý vzorek [ml] | zředěný roztok KS [ml] | fyziol. roztok[ml] |
| 1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,000 |
| 2 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 1,6 |  |  |
| 3 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 1,2 |  |  |
| 4 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,8 |  |  |
| 5 | 1,6 | 0,0 | 0,0 | 0,4 |  |  |
| 6 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |  |  | Ø A280 |
| 7 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | **?** |  |  |
| 8 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 |  |
| 9 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | **?** |  |  |
| 10 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 |  |

Změřte absorbanci roztoků ve zkumavkách 2-10 při vlnové délce 280 nm proti slepému vzorku (zkumavka č.1). **Měření provádějte v plastových kyvetách pro UV oblast.** Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek zřeďte v poměru 1:1 fyziologickým roztokem a naměřenou hodnotu absorbance vynásobte dvěma. Výsledky uveďte do tabulky.

***Studium absorpčního spektra bílkovin.*** Prostudujte absorpční spektra roztoků fenylalaninu, tyrosinu, tryptofanu a zředěného standardního vzorku BSA v oblasti vlnových délek 230 - 300 nm, která jsou uložena v počítači. Pro každou látku odečtěte vlnovou délku λmax absorpčního maxima, dále hodnoty absorbance Amax v absorpčním maximu, zapište si koncentraci látky c a ze získaných dat vypočítejte hodnoty ε milimolárních nebo miligramových absorpčních koeficientů (délka optické dráhy v kyvetě je vždy 1 cm). Získaná a vypočtená data uveďte do tabulky.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | λmax [nm] | c | Amax | ε(uveďte fyzikální rozměr!) |
| Phe |  |  mmol.l-1 |  |  |
| Tyr |  |  mmol.l-1 |  |  |
| Trp |  |  mmol.l-1 |  |  |
| BSA |  |  mg.ml-1 |  |  |

**Vyhodnocení:**

Vypočítejte koncentrace BSA ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky. Vypočítejte průměr absorbancí ve zkumavkách č. 7-8 a 9-10 a doplňte do tabulky.

Sestrojte kalibrační graf (závislost A280na koncentraci BSA ve zkumavce). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte **koncentraci BSA ve zředěném neznámém vzorku** **a ve zředěném krevním séru** (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek při přípravě zředěného neznámého vzorku a kolikrát bylo zředěno krevní sérum.

Ředění neznámého vzorku:krát

Ředění krevního séra : krát

Tímto faktorem vynásobte koncentraci BSA ve zředěném neznámého vzorku a ve zředěném krevním séru, abyste získali koncentraci BSA v původním neznámého vzorku a v krevním séru.

**Výsledek:**

**koncentrace BSA v neznámém vzorku: c = mg.ml-1**

**koncentrace bílkovin v krevním séru: c = mg.ml-1**

**PRAKTICKÁ ČÁST B. Stanovení hmotnostního zlomku tyrosinu a tryptofanu v bílkovině**

**Materiál a vybavení:**

standardní roztok bílkoviny - hovězí sérový albumin (**BSA**) (2,5 mg.ml-1)

0,2 mol.l-1 hydroxid sodný

0,1 mol.l-1 hydroxid sodný

*zkumavky, pipety, dávkovače, vortex, fotometr, UV-propustné kyvety*

**Postup:**

K 1 ml standardního roztoku BSA přidejte 1 ml 0,2 mol.l-1 roztoku NaOH a dále 3 ml roztoku 0,1 mol.l-1 NaOH. Změřte absorbanci vzorku při vlnových délkách 280 a 294 nm proti vodě a zapište do tabulky. **Měření provádějte v plastových kyvetách pro UV oblast.**

|  |  |
| --- | --- |
| A280, BSA : |  |
| A294, BSA: |  |

**Vyhodnocení:**

Pro stanovení hmotnostního zlomku Tyr a Trp v BSA si nejprve vypočítejte miligramové absorpční koeficienty (na základě tabulkových molárních absorpčních koeficientů a známé relativní molekulové hmotnosti látek), vypočtené hodnoty doplňte do tabulky.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | λ[nm] | ε [mol-1.l.cm-1]\* | *M*r | ε [mg-1.ml.cm-1]\* |
| Tyr | 280 | 1576 | 181,2 |  |
| 294 | 2375 |  |
| Trp | 280 | 5225 | 204,2 |  |
| 294 | 2375 |  |

\*absorpční koeficient pro Tyr nebo Trp rozpuštěný v 0,1 mol.l-1 NaOH

Přijměte zjednodušení, že roztok BSA je směsí aminokyselin (zanedbáváme vliv uspořádaných struktur v bílkovině na absorpci UV záření aromatickými jádry aminokyselin obsažených v BSA) a vypočtěte hmotnostní koncentraci Tyr a Trp v roztoku BSA řešením soustavy 2 rovnic o 2 neznámých:

**A280,BSA= cTyr . ε280,Tyr + cTrp . ε280,Trp**

**A294,BSA= cTyr . ε294,Tyr + cTrp . ε294,Trp**

Výpočet:

**cTyr = mg.ml-1 cTrp = mg.ml-1**

Vypočítejte koncentraci BSA ve vzorku (po zředění) a hmotnostní zlomek tyrosinu a tryptofanu v BSA:

**cBSA = mg.ml-1**

**wTyr  = % wTrp = %**

:

Odpovězte na následující otázky:

Kolik druhů aminokyselin obsahují (běžně) bílkoviny?

Jaký je přibližný hmotnostní zlomek každé aminokyseliny v bílkovinách? (předpokládejte rovnoměrné zastoupení všech aminokyselin a jejich přibližně stejnou molekulovou hmotnost)

Které aminokyseliny se nejvíce podílí na absorpci bílkovin v oblasti kolem 280 nm?

Kolik % těchto aminokyselin obsahuje BSA (viz předchozí měření)?

Jaký je absorpční koeficient (při 280 nm) BSA (viz část A úlohy)?

Miligramový absorpční koeficient (při 280 nm) většiny bílkovin se pohybuje v rozmezí 1–5 mg-1.ml.cm-1 . Srovnejte s nimi miligramový absorpční koeficient BSA a rozdíl vysvětlete.

**PRAKTICKÁ ČÁST C. Stanovení bílkovin Folinovou metodou**

**Materiál a vybavení:**

standardní roztok bílkoviny - hovězí sérový albumin (BSA) (2,5 mg.ml-1)

**neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu (obsahuje BSA o neznámé koncentraci)**

hovězí krevní sérum (KS)

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

5 mol.l-1 hydroxid sodný

Folinovo činidlo (roztok fosfomolybdenanu a fosfowolframanu)

*zkumavky, pipety, dávkovače, odměrné baňky 10 ml, vortex, fotometr, kyvety*

**Postup:**

Standardní roztok BSA (2,5 mg.ml-1) zřeďte tak, že 1 ml standardního roztoku BSA doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promícháte. Stejným způsobem zřeďte neznámý vzorek BSA. Vzorek krevního séra zřeďte tak, že 0,2 ml KS doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml, dobře promícháte, a z takto naředěného roztoku odeberete 1 ml, který v další odměrné baňce doplníte fyziologickým roztokem na objem 10 ml a promícháte. Podle tabulky připravte jednak sadu roztoků vzorků o šesti známých koncentracích BSA k sestrojení kalibrační závislosti (zkumavky 1-6), dále 2 paralelní zkumavky s roztokem BSA o neznámé koncentraci (zkumavky 7-8) a 2 zkumavky ze zředěným roztokem KS (zkumavky 9-10). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok - nulová koncentrace bílkoviny) použijete později jako slepý vzorek.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| zkumavkač. | pipetovaný objem | vypočtenác(BSA) [mg.ml-1] | A745 |
| zředěný standardní roztok BSA [ml] | zředěný neznámý vzorek [ml] | zředěný roztok KS [ml] | fyziol. roztok[ml] |
| 1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,000 |
| 2 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 1,6 |  |  |
| 3 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 1,2 |  |  |
| 4 | 1,2 | 0,0 | 0,0 | 0,8 |  |  |
| 5 | 1,6 | 0,0 | 0,0 | 0,4 |  |  |
| 6 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |  |  | Ø A745 |
| 7 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | **?** |  |  |
| 8 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 |  |
| 9 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 | **?** |  |  |
| 10 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 |  |

Poté do všech zkumavek 1-10 pipetujte vždy 0,2 ml 5 mol.l-1 NaOH, promíchejte na vortexu, připipetujte 0,3 ml Folinova činidla a opět promíchejte. Po 5 minutách stání při laboratorní teplotě změřte absorbanci při vlnové délce 745 nm proti slepému vzorku (zkumavka č.1). **Měření provádějte v běžných plastových kyvetách.** Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek zřeďte v poměru 1:1 fyziologickým roztokem a naměřenou hodnotu absorbance vynásobte dvěma. Výsledky uveďte do tabulky.

**Vyhodnocení:**

Vypočítejte koncentrace BSA ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky. Vypočítejte průměr absorbancí ve zkumavkách č. 7-8 a 9-10 a doplňte do tabulky.

Sestrojte kalibrační graf (závislost A745na koncentraci BSA ve zkumavce). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte **koncentraci BSA ve zředěném neznámém vzorku** **a ve zředěném krevním séru** (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek při přípravě zředěného neznámého vzorku a kolikrát bylo zředěno krevní sérum.

Ředění neznámého vzorku:krát

Ředění krevního séra : krát

Tímto faktorem vynásobte koncentraci BSA ve zředěném neznámého vzorku a ve zředěném krevním séru, abyste získali koncentraci BSA v původním neznámého vzorku a v krevním séru.

**Výsledek:**

**koncentrace BSA v neznámém vzorku: c = mg.ml-1**

**koncentrace bílkovin v krevním séru: c = mg.ml-1**

**PRAKTICKÁ ČÁST D.** **Stanovení koncentrace proteinů bicinchoninovou metodou**

**Materiál a vybavení:**

standardní roztok bílkoviny – hovězí sérový albumin (BSA) (2,5 mg.ml-1)

**neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu (obsahuje BSA o neznámé koncentraci)**

hovězí krevní sérum (KS)

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný)

roztok A (0,1 % kyselina bicinchoninová, 2 % Na2CO3.H2O, 0,16 % monohydrát vínanu sodného, 0,95 % NaHCO3, pH 11,25 upravené NaOH)

roztok B (5 % CuSO4.5H2O)

*mikrozkumavky 1,5ml a 2ml, pipety, dávkovače, kádinky 50 ml, fotometr, kyvety, termoblok*

**Postup:**

Smíchejte v kádince 35 ml roztoku A s 0.7 ml roztoku B, čímž vznikne roztok C. Standardní roztok BSA (2,5 mg.ml-1) zřeďte tak, že smícháte ve 2.0 ml mikrozkumavce 0.5 ml standardního roztoku BSA s 1 ml fyziologického roztoku a dobře promícháte. Stejným způsobem zřeďte neznámý vzorek BSA. Vzorek krevního séra zřeďte tak, že 0,2 ml KS doplníte v odměrné baňce fyziologickým roztokem na objem 10 ml a dobře promícháte. Podle tabulky připravte jednak sadu paralelních roztoků vzorků o šesti známých koncentracích BSA k sestrojení kalibrační závislosti (zkumavky 1-10), dále 2 paralelní zkumavky s roztokem BSA o neznámé koncentraci (zkumavky 11-12) a 2 paralelní zkumavky se zředěným roztokem KS (zkumavky 13-14). Obsah zkumavek promíchejte na vortexu. Obsah zkumavky č. 1 (fyziologický roztok – nulová koncentrace bílkoviny) použijete později jako slepý vzorek.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Mikrozkumavka (2.0 ml)č. | pipetovaný objem | vypočtenác(BSA) [mg.ml-1] | A562 | Ø A562 |
| zředěný standardní roztok BSA [µl] | zředěný neznámý vzorek [µl] | zředěný roztok KS [µl] | fyziol. roztok[µl] |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 200 | 0,0 | 0,000 |  |
| 2 | 25 | 0 | 0 | 175 |  |  |  |
| 2 | 25 | 0 | 0 | 175 |  |
| 3 | 50 | 0 | 0 | 150 |  |  |  |
| 4 | 50 | 0 | 0 | 150 |  |
| 5 | 100 | 0 | 0 | 100 |  |  |  |
| 6 | 100 | 0 | 0 | 100 |  |
| 7 | 150 | 0 | 0 | 50 |  |  |  |
| 8 | 150 | 0 | 0 | 50 |  |
| 9 | 200 | 0 | 0 | 0 |  |  |  |
| 10 | 200 | 0 | 0 | 0 |  |
| 11 | 0 | 200 | 0 | 0 | **?** |  |  |
| 12 | 0 | 200 | 0 | 0 |  |
| 13 | 0 | 0 | 200 | 0 | **?** |  |  |
| 14 | 0 | 0 | 200 | 0 |  |

Poté do všech zkumavek 1-14 pipetujte vždy 1,6 ml roztoku C a promíchejte na vortexu. Po 30 minutách inkubace při 60 °C v termobloku a následném zchladnutí vzorků za laboratorní teploty po dobu 5 minut změřte absorbanci při vlnové délce 562 nm proti slepému vzorku (zkumavka č.1). **Měření provádějte v běžných plastových kyvetách.** Přesahuje-li absorbance některého ze vzorků hodnotu 0,8, vzorek zřeďte v poměru 1:1 fyziologickým roztokem a naměřenou hodnotu absorbance vynásobte dvěma. Výsledky uveďte do tabulky.

**Vyhodnocení:**

Vypočítejte koncentrace BSA roztoků č. 1-10, výsledky doplňte do tabulky. Vypočítejte průměr absorbancí roztoků č. 2-6 a neznámého vzorku BSA nebo vzorku krevního séra.

Sestrojte kalibrační graf (závislost A562na koncentraci BSA v mikrozkumavce). Z rovnice kalibrační přímky, kterou zobrazíte v grafu, pak vypočítejte **koncentraci BSA v neznámém vzorku** **a ve zředěném krevním séru** (výpočet uveďte níže):

Vypočítejte, kolikrát byl zředěn původní neznámý vzorek při přípravě zředěného neznámého vzorku a kolikrát bylo zředěno krevní sérum.

Ředění neznámého vzorku:krát

Ředění krevního séra : krát

Tímto faktorem vynásobte koncentraci BSA ve zředěném neznámého vzorku a ve zředěném krevním séru, abyste získali koncentraci BSA v původním neznámého vzorku a v krevním séru.

**Výsledek:**

**koncentrace BSA v neznámém vzorku: c = mg.ml-1**

**koncentrace bílkovin v krevním séru: c = mg.ml-1**

**Souhrn výsledků:**

**koncentrace bílkoviny ve vzorku BSA o neznámé koncentraci**

**zjištěná fotometricky při λ=280 nm: c = mg.ml-1**

**zjištěná Folinovou metodou c = mg.ml-1**

**zjištěná bicinchoninovou metodou c = mg.ml-1**

**Souhrn výsledků:**

**koncentrace bílkoviny v krevním séru**

**zjištěná fotometricky při λ=280 nm: c = mg.ml-1**

**zjištěná Folinovou metodou c = mg.ml-1**

**zjištěná bicinchoninovou metodou c = mg.ml-1**

Pokuste se o vysvětlení rozdílů mezi výsledky stanovení koncentrací bílkoviny v tomtéž vzorku různými metodami. Kromě případných experimentálních chyb hledejte příčiny v chemických principech jednotlivých metod. Kterou z použitých metod považujete za nejpřesnější?

**KONTROLNÍ LIST**

|  |
| --- |
| **jméno:** |
| **obor:** | **datum provedení:** |
| **neznámý vzorek pro kvantitativní analýzu**a b c d e f g h (zakroužkujte) |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **ÚLOHA 4A** | **ÚLOHA 4C** | **ÚLOHA 4D** | **ÚLOHA 4D** |
| Zkumavka/roztok č. | A280 | A745 | A5621.měření | A5622.měření |
| 1 | 0,000 | 0,000 |  |  |
| 2 |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |
| 8 |  |  |  |  |
| 9 |  |  |
| 10 |  |  |

Podpis vedoucího cvičení:

**ÚLOHA 4A**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | λmax [nm] | c | Amax |
| Phe |  |  mmol.l-1 |  |
| Tyr |  |  mmol.l-1 |  |
| Trp |  |  mmol.l-1 |  |
| BSA |  |  mg.ml-1 |  |

Podpis vedoucího cvičení:

**ÚLOHA 4B**

|  |  |
| --- | --- |
| A280, BSA : |  |
| A294, BSA: |  |

Podpis vedoucího cvičení: