Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Wydziału Biologii UG

Skrypt do ćwiczeń laboratoryjnych
Wstęp do biochemii

SPIS TREŚCI

LITERATURA 2

1. IZOLACJA PLAZMIDOWEGO DNA Escherichia coli METODĄ LIZY ALKALICZNEJ ORAZ ELEKTROFOREZA DNA W ŻELU AGAROZOWYM 3

2. ELEKTROFOREZA BIAŁEK I REAKCJE CHARAKTERYSTYCZNE AMINOKWASÓW 11

3. CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA NA ŻELU SEPHADEX G-75 20

4. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI KWAŚNEJ FOSFATAZY W HOMOGENACIE Z KIEŁKÓW ROŚLINNYCH 27

5. HAMOWANIE KOMPETYCYJNE I NIEKOMPETYCYJNE AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY BURSZTYNIANOWEJ 40

6. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA I CHARAKTERYSTYKA CUKRÓW 44

7. CHROMATOGRAFIA BIBUŁOWA I CHARAKTERYSTYKA LIPIDÓW 54

8. ROZDZIAŁ BARWNIKÓW LIŚCI METODĄ KOLUMNOWEJ CHROMATOGRAFII ADSORPCYJNEJ (ćwiczenie dodatkowe) 60

WZORY 67

LITERATURA

Literatura pomocna w przygotowaniu się do zajęć laboratoryjnych:

1. Tymoczko J.L., Berg J.M., Stryer L., Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009 (lub wcześniejsze wydania pod redakcją L. Stryera, PWN, Warszawa, 1999, 2003)

2. Tymoczko J.L., Berg J.M., Stryer L., Biochemia Krótki Kurs, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013.

3. Kłyszejko-Stefanowicz L., Ćwiczenia z biochemii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005

4. red. Minakowski W, Weidner S., Biochemia kręgowców, wydanie II, Wydawnictwo naukowe PWN SA, Warszawa 1998 lub 2005.

1. IZOLACJA PLAZMIDOWEGO DNA Escherichia coli METODĄ LIZY ALKALICZNEJ ORAZ ELEKTROFOREZA DNA W ŻELU AGAROZOWYM

I. ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA:

- ✓ Budowa kwasów nukleinowych: DNA i RNA (model budowy DNA wg Watsona-Cricka, pojęcia nukleotyd, nukleozyd, różnice w budowie DNA i RNA, wzory strukturalne kwasów nukleinowych, ze wzorami zasad azotowych i cukrów włącznie).
- ✓ DNA jako nośnik informacji genetycznej (definicja genu, powstawanie mutacji).
- ✓ Metody przekazywania plazmidowego DNA u bakterii – horyzontalny transfer genów: transformacja, transdukcja, koniugacja.
- ✓ Organizacja DNA w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych.
- ✓ Przebieg replikacji DNA w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych (etapy, enzymy uczestniczące w procesie replikacji oraz ich funkcje w poszczególnych etapach).
- ✓ Rodzaje i funkcje RNA.
- ✓ Plazmidy (pojęcie, funkcje, cechy).
- ✓ Znajomość metody lizy alkalicznej (cel metody, skład i rola stosowanych roztworów)
- ✓ Elektroforeza DNA w żelu agarozowym (cel, zasada rozdziału).
- ✓ Dokładna znajomość części doświadczalnej oraz umiejętność sprawnego przeliczania stężeń.

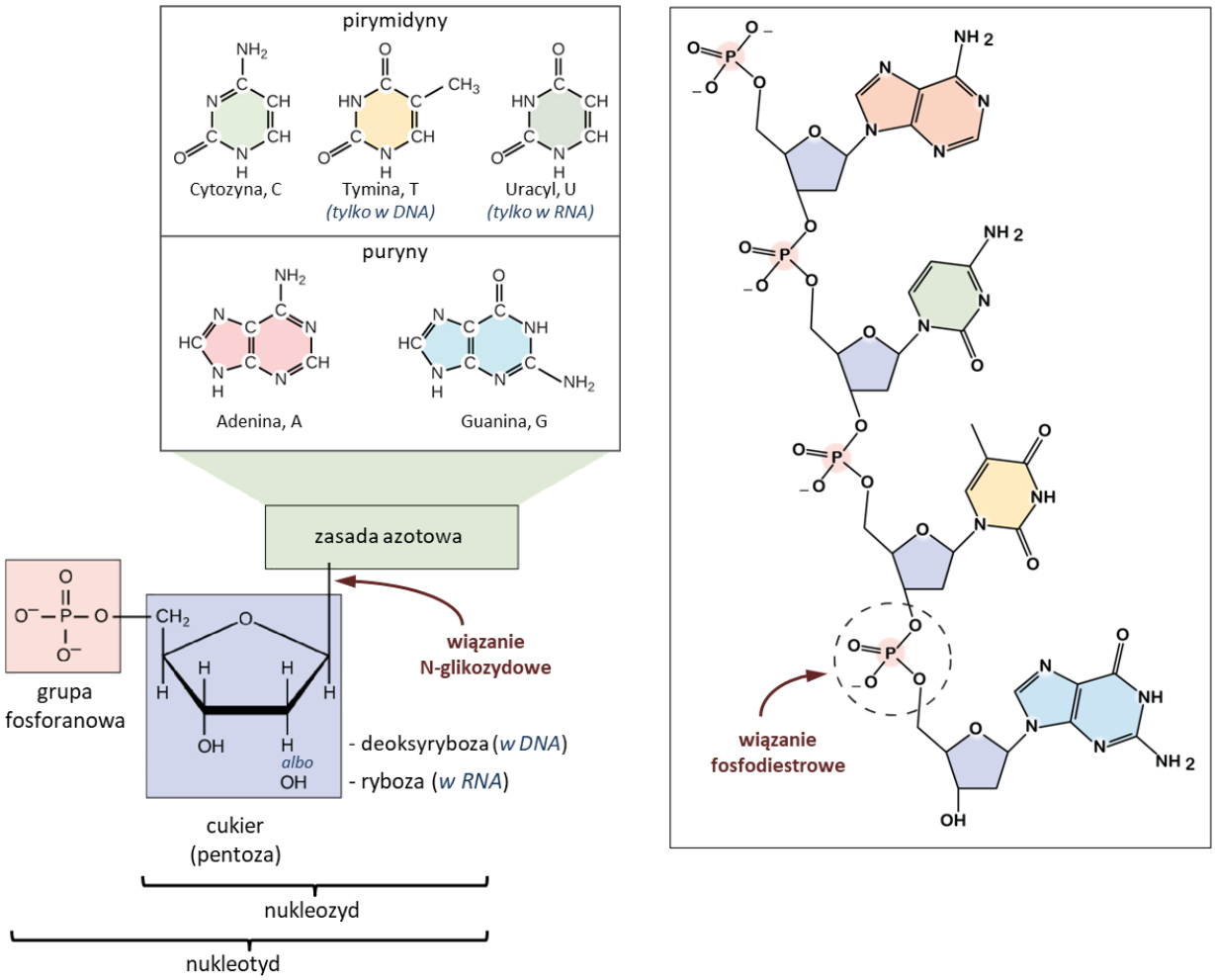
II. WSTĘP

Kwasy nukleinowe (DNA i RNA) są polinukleotydami, czyli długimi łańcuchami zbudowanymi z nukleotydów. Każdy nukleotyd składa się z zasady azotowej, pięciowęglowej cząsteczki cukru (pentozy) oraz reszty kwasu fosforowego (V). Zasadami azotowymi występującymi w DNA są puryny (adenina i guanina) oraz pirymidyny (cytozyna i tymina). W RNA zamiast tyminy występuje uracyl. Cukrem wchodzącym w skład DNA jest deoksyryboza, zaś w RNA ryboza. Zasady azotowe połączone wiązaniem N- glikozydowym z rybozą lub deoksyrybozą tworzą <u>nukleozydy</u>. Nukleozydy z resztą kwasu fosforowego tworzą <u>nukleotydy</u>. Poszczególne nukleotydy są ze sobą połączone wiązaniami fosfodiestrowymi. Wiązania te występują pomiędzy grupą fosforanową jednego nukleotydu i cukrem (rybozą lub deoksyrybozą) sąsiedniego nukleotydu (rys. 1).

RNA występuje z reguły w postaci jednoniciowej, ale niektóre cząsteczki RNA mogą zawierać odcinki komplementarne, co umożliwia tworzenie wewnątrzcząsteczkowych rejonów dwuniciowych. Natomiast DNA jest helisą zbudowaną zazwyczaj z dwóch owiniętych wokół siebie łańcuchów polinukleotydowych biegnących antyrównolegle. Na zewnątrz helisy DNA występuje rdzeń fosforanowo-cukrowy, a wewnątrz znajdują się zasady, pomiędzy którymi tworzą się wiązania wodorowe. Adenina tworzy komplementarną parę z tyminą (dwa wiązania wodorowe), a guanina z cytozyną (trzy wiązania wodorowe).

W komórkach eukariotycznych (jądrzastych) DNA występuje głównie w jądrze komórkowym oraz w małych ilościach w chloroplastach i mitochondriach. DNA w jądrze jest liniowy i upakowany w postaci chromosomów.

W komórkach prokariotycznych (bezjądrzastych) DNA występuje w cytoplazmie, ma postać kolistą i jest nazywany nukleoidem lub chromosomem bakteryjnym. DNA chromosomu bakteryjnego przyjmuje postać negatywnie skręconej superhelisy i tworzy kompleksy z białkami podobnymi do histonów.

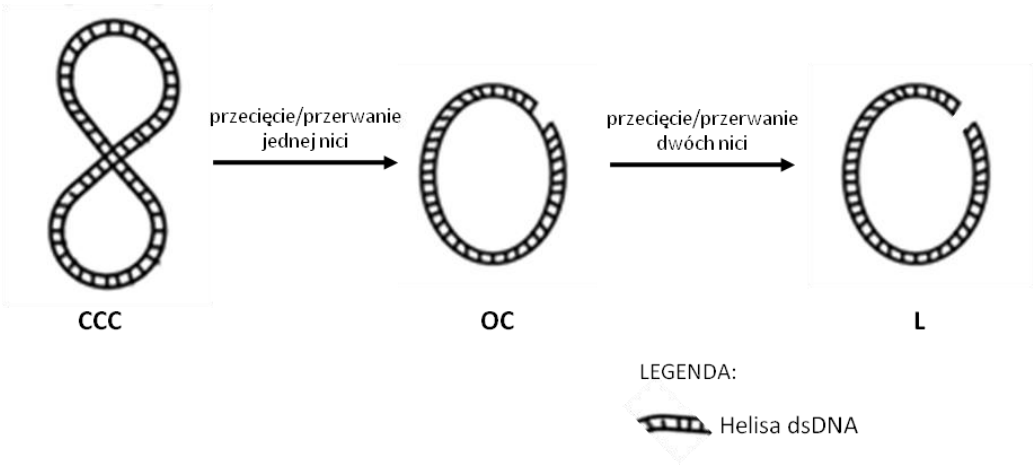


Rys.1. Budowa nukleotydu w łańcuchu polinukleotydowym

Komórki bateryjne mogą zawierać dodatkowe, niewielkie cząsteczki DNA, nazywane plazmidami, które replikują się niezależnie od chromosomu. Mogą one występować w kilku (niskokopijne) lub w wielu (wysokokopijne) kopiach w komórce. Zazwyczaj zawierają one kilka genów, w tym gen (geny) warunkujący(e) oporność na antybiotyk(i). Plazmidy są często wykorzystywane w inżynierii genetycznej jako wektory w klonowaniu molekularnym.

Plazmidy są kolistymi cząsteczkami DNA przyjmującymi formę superhelisy (Rys. 1). Superzwinięta, kowalencyjnie zamknięta, kolista cząsteczka DNA nazywana jest formą CCC (ang. *Covalently Closed Circular DNA*). Jeśli jedna z nici DNA zostanie przerwana, znikają superskręty i powstaje forma OC (ang. *Open Circular*),

natomiast w wyniku pęknięcia obu nici DNA w tym samym miejscu, powstaje cząsteczka w formie liniowej L (ang. *Linear*) plazmidu (rys. 2).



Rys. 2. Formy plazmidowego DNA.

Izolacja plazmidowego i chromosomalnego DNA z komórek prokariotycznych i eukariotycznych wymaga zastosowania odmiennych technik. Obecnie istnieje wiele metod pozyskiwania DNA, których celem jest odseparowanie materiału genetycznego od innych składników komórki i jego ochrona przed degradacją przez enzymy komórkowe. Techniki oczyszczania DNA muszą być wystarczająco łagodne, aby nie spowodować uszkodzeń mechanicznych łańcucha polinukleotydowego DNA.

Różnice w procedurach izolacji plazmidowego i genomowego DNA wynikają przede wszystkim z superzwinięcia plazmidowego DNA, jak również z różnych mas cząsteczkowych i konformacji DNA.

Metody izolacji plazmidowego DNA są znane od ponad 35 lat i do dziś powstało ich kilkanaście. Mimo to większość z nich składa się z podobnych etapów: namnożenia bakterii, lizy komórek bakteryjnych i oczyszczania plazmidowego DNA. Najlepsze są te metody, które charakteryzują się dużą efektywnością, pozwalającą na uzyskanie czystego preparatu o wysokim stężeniu i pochłaniają stosunkowo niewiele czasu. Jednym z najbardziej popularnych sposobów izolacji plazmidowego DNA jest **metoda lizy alkalicznej** znana od 1979 roku (Birnboim i Doly, Nucleic Acids Res 1979;7:1513-23). Metoda ta wykorzystuje fakt występowania plazmidowego DNA w formie superzwiniętej (CCC).

W metodzie tej można wyróżnić trzy podstawowe etapy:

- PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO LIZY: zawieszenie komórek bakteryjnych w roztworze R1 obniżającym wytrzymałość ściany komórkowej i hamującym działanie DNaz. Roztwór R1 zawiera Tris-HCl o pH 8.0 (tworzy środowisko wodne o stałym pH), EDTA (chelatuje jony magnezu, niezbędne do aktywacji nukleaz - enzymów degradujących DNA) oraz glukozę (utrzymuje odpowiednie rozproszenie komórek w roztworze).
- LIZA ALKALICZNA: dodanie roztworu R2, zawierającego wysokie stężenie NaOH (podwyższenie pH do ok. 12) oraz detergent SDS (dodecylosiarczan sodu, który niszczy błony komórkowe) co prowadzi do

lizy komórek. Wysokie pH powoduje odwracalną denaturację kwasów nukleinowych, a SDS nieodwracalną denaturację białek. Dodanie enzymu RNazy na tym etapie, powoduje degradację RNA. Denaturacja DNA polega na rozerwaniu wiązań wodorowych, łączących dwie komplementarne nici DNA , w wyniku czego helisa rozplata się. W przypadku DNA genomowego obie nici mogą odsunąć się od siebie na znaczną odległość, natomiast w przypadku plazmidowego DNA, superzwinięcie (forma CCC) powoduje, że mimo zerwania wiązań wodorowych nici komplementarne pozostają blisko siebie.

- RENATURACJA DNA: dodatnie roztworu R3, który zawiera reszty kwasu octowego, obniżającego pH roztworu do odczynu zbliżonego do obojętnego. W wyniku neutralizacji pH następuje renaturacja DNA, czyli ponowne utworzenie wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi nićmi DNA. Genomowe DNA renaturuje tylko na krótkich odcinkach, pozostając w głównej mierze „splątane" i zdenaturowane (ulega precypitacji -powstają strąty/osad). W superzwiniętym plazmidowym DNA odtworzenie wiązań wodorowych dla dwóch komplementarnych nici zachodzi efektywnie, w wyniku czego cząsteczka DNA renaturuje w całości (pozostaje w formie rozpuszczonej w roztworze). RNA (jeśli nie zostało zhydrolizowane przez RNazę) oraz zdenaturowane białka ulegają precypitacji (osad).

Następnie przeprowadza się OCZYSZCZANIE plazmidowego DNA od genomowego DNA, wytrąconych białek i resztek komórkowych. W tym celu próbę wiruje się (mechaniczne oddzielenie osadu od fazy wodnej), a supernatant miesza z wysokim stężeniem soli chotropowych (roztwór G, chlorek guanidyny) i nanosi na mini-kolumnę ze specjalnym złożem krzemionkowym. DNA przechodząc przez złoże, osiada na nim, podczas gdy zanieczyszczenia przechodzą, nie wiążąc się. Po wypłukaniu z kolumny resztek zanieczyszczeń roztworem A1, oczyszczone plazmidowe DNA wymywane jest buforem TE, Tris-HCl lub wodą (ELUCJA) i nadaje się do bezpośredniego wykorzystania bez konieczności precypitacji. DNA uzyskane przy tej metodzie doskonale nadaje się do wszelkich metod stosowanych w biologii molekularnej, w tym do automatycznego sekwencjonowania.

Wyizolowany plazmidowy DNA zazwyczaj analizuje się wykorzystując elektroforezę w żelu agarozowym**.** Elektroforeza jest techniką wykorzystującą przemieszczanie się cząsteczek obdarzonych ładunkiem w polu elektrycznym. Technika ta, wykorzystywana przez biochemików i biologów molekularnych od ponad 50 lat, jest szczególnie przydatna do rozdziału, charakterystyki, analizy i oczyszczania kwasów nukleinowych. Fragmenty DNA rozdzielone w żelu agarozowym można też wykorzystać na różnych etapach klonowania molekularnego, np. ligacji.

Żele agarozowe stosuje się najczęściej w zakresie stężeń od 0,3% do 2%. Procentowość żelu dobiera się do wielkości rozdzielanych cząsteczek DNA. Fragmenty DNA o długości mniejszej niż 500 pz (par zasad)

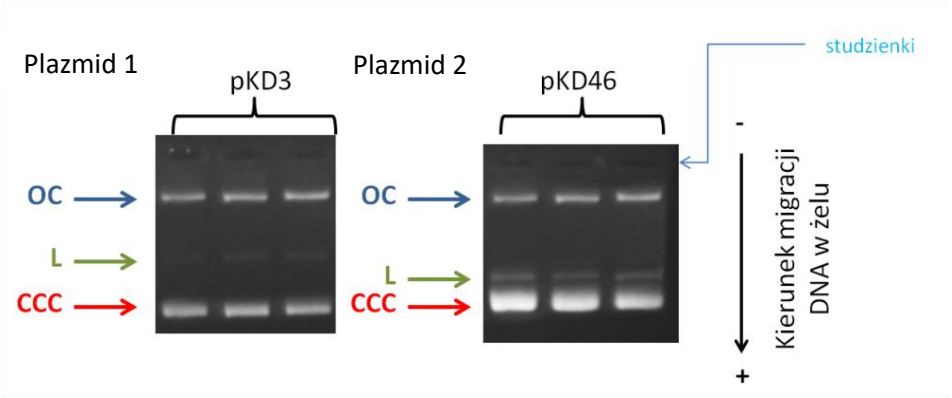
zazwyczaj rozdziela się w żelach poliakryloamidowych. Najczęściej stosowanymi buforami w elektroforezie agarozowej są: TAE (ang. *Tris-acetate-EDTA*), TBE (ang. *Tris-borate-EDTA*), TPE (ang. *Tris-phosphate-EDTA*).

Próbę nanosi się w studzienki odpowiednio uformowanego żelu, który jest umieszczony w buforze do prowadzenia elektroforezy. Przed nałożeniem, próbę miesza się z tzw. buforem obciążającym, zwiększającym jej gęstość, dzięki czemu nie dyfunduje ona do buforu, w którym prowadzi się elektroforezę, lecz opada na dno studzienki. Dodatkowo bufor obciążający nadaje próbkom zabarwienie, umożliwiając obserwację ich migracji podczas rozdziału w żelu. Najczęstszym składnikiem buforów do nanoszenia jest błękit bromofenolowy, nadający niebieskie zabarwienie, a czynnikiem zwiększającym gęstość sacharoza lub glicerol.

DNA w żelu agarozowym migruje w kierunku elektrody dodatniej ze względu na ujemnie naładowane reszty fosforanowe. Szybkość migracji DNA zależy m.in. od stężenia żelu, składu i siły jonowej buforu elektrodowego, natężenie pola elektrycznego oraz wielkości i konformacji kwasu nukleinowego. Mniejsze liniowe cząsteczki DNA migrują szybciej niż większe. Jednak nawet jeśli cząsteczki mają tę samą masę mogą poruszać się z różną szybkością ze względu na różnice w ich konformacji. W żelach agarozowych ruchliwość elektroforetyczna kwasów nukleinowych nie zmienia się w istotny sposób w zależności od składu zasad ani od temperatury rozdziału.

Formy plazmidowego DNA (CCC, OC, L) mają odmienną konformację przestrzenną, zatem mimo tej samej masy migrują w żelach z różną szybkością. Położenie fragmentów DNA w żelu agarozowym można określić wybarwiając DNA bromkiem etydyny. Jest to barwnik fluorescencyjny, który interkaluje między zasady azotowe i świeci w świetle UV. W celu wybarwienia DNA bromek etydyny dodaje się bezpośrednio do przygotowanego roztworu agarozy jeszcze przed zastygnięciem żelu lub barwi się żel w kąpieli wodnej po zakończonym rozdziale elektroforetycznym.

W buforze TAE najszybciej migruje forma CCC, następnie formy liniowa i OC. Dzięki temu w pojedynczej ścieżce w żelu widać trzy prążki, odpowiadające różnym formom plazmidowego DNA; grubość prążka (intensywność świecenia) jest tym większa im wyższe jest stężenie DNA o danej konformacji (rys. 3).



Rys. 3. Przykładowy wynik rozdziału dwóch różnych plazmidów w żelu agarozowym. Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym żele wybarwiono w roztworze bromku etydyny.

III. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

1. Mikrowirówka (jedna na grupę)
2. Probówki typu Eppendorf
3. Pipety automatyczne (2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl)
4. Końcówki do pipet automatycznych
5. Aparat do elektroforezy agarozowej (jeden na grupę), zestaw do formowania żelu
6. Zasilacz prądu stałego
7. Transiluminator

IV. ODCZYNNIKI

1. Osad bakteryjny z 1,5-3ml nocnej hodowli bakteryjnej *E. coli*
2. Roztwór **R1**: 50 mM glukoza, 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0
3. Roztwór **R2**: 0,2 M NaOH, 1 % SDS

UWAGA! Roztwór R2 przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

4. Roztwór **R3**: 3 M CH_3COOK pH 4.8
5. Roztwór **G**: 6M chlorowodorek guanidyny
6. Roztwór **A1**: 50% etanol; 250 mM NaCl
7. Bufor TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
8. Agaroza
9. Bufor 50x TAE: 40 mM Tris-octan pH 8,0, 1 mM EDTA
10. Bufor obciążający do elektroforezy DNA: 0,25 % błękit bromofenolowy, 40 % sacharoza
11. Wodny roztwór bromku etydyny (5 mg/ml)
12. Roztwór plazmidu wzorcowego

V. WYKONANIE ĆWICZENIA

Izolacja plazmidowego DNA

1. Osad bakteryjny dokładnie zawiesić przez pipetowanie lub worteksowanie w 0,2 ml buforu do zawieszania **R1**.
2. Dodać 0,2 ml alkalicznego roztworu lizującego **R2** i po wymieszaniu przez kilkukrotne odwracanie probówki, pozostawić na 3 minuty w temperaturze pokojowej.

Uwaga! Po dodaniu roztworu R2 należy ostrożnie mieszać zawartość probówki, aby nie spowodować fragmentacji chromosomalnego DNA. Zwykle wystarczy 5-6-krotne odwrócenie probówki. Po 3 minutach inkubacji lizat powinien być całkowicie klarowny. Jeżeli nie jest, to należy ponownie wymieszać zawartość probówki poprzez kilkukrotne odwrócenie probówki i przedłużyć czas inkubacji o dalsze 3 minuty.

3. Dodać 0,2 ml buforu zobojętniającego **R3** i wymieszać przez kilkukrotne odwracanie probówki.
4. Wirować przez 10 min w mikrowirówce przy maksymalnych obrotach/min.
5. Ostrożnie wlać supernatant do nowej probówki i dodać 0,4 ml roztworu G.
6. Całość wymieszać i wlać do mini-kolumny do oczyszczania plazmidowego DNA
7. Wirować przez 1 min w mikrowirówce przy maksymalnych obrotach/min.
8. Wyciągnąć mini-kolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie włożyć ją do probówki.
9. Dodać do kolumny 0,5 ml roztworu płuczącego A1
10. Wirować przez 1 min w mikrowirówce przy maksymalnych obrotach/min.
11. Wyciągnąć mini-kolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie włożyć ją do probówki.
12. Dodać do kolumny 0,7 ml roztworu płuczącego A1
13. Wirować przez 2 min w mikrowirówce przy maksymalnych obrotach/min.
14. Wyciągnąć mini-kolumnę z probówki, wylać przesącz i ponownie włożyć ją do probówki.
15. Wirować „na sucho" przez 0,5 min w mikrowirówce przy maksymalnych obrotach/min.
16. Osuszoną mini-kolumnę umieścić w nowej probówce o pojemności 1,5 ml i do złoża znajdującego się na dnie kolumny dodać 60 µl buforu TE, Tris-HCl lub wody.
17. Próbkę inkubować 3 min w temperaturze pokojowej
18. Wirować przez 1 min w mikrowirówce przy maksymalnych obrotach/min.
19. Kolumnę usunąć, a oczyszczone plazmidowe DNA, znajdujące się w probówce, przetrzymywać w lodówce do czasu dalszych analiz.

Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

1. Przygotować aparat do elektroforezy.
2. Przygotować 1 % roztwór agarozy w buforze TAE (rozpuścić przez ogrzanie do wrzenia).
3. Do przestudzonego roztworu agarozy dodać bromek etydyny do stężenia 0,5 µg/ml.
4. Schłodzony do 45-50°C roztwór agarozy wlać do aparatu i pozostawić do zastygnięcia.
5. Do preparatu DNA dodać 3 µl buforu obciążającego.
6. 10 µl próbki nanieść w studzienkę żelu.
7. Przeprowadzić rozdział elektroforetyczny DNA przy napięciu 70-80V przez 30-40 min.
8. Oglądać żel w świetle UV.

Uwaga! Bromek etydyny jest bardzo silnym środkiem mutagennym, wszystkie czynności powinny być wykonywane w rękawiczkach.

VI. WYNIKI I WNIOSKI - SPRAWOZDANIE

1. Temat ćwiczenia
2. Cel
3. Wkleić zdjęcie rozdziału elektroforetycznego plazmidowego DNA
4. Opisać wynik rozdziału elektroforetycznego plazmidowego DNA (zaznaczyć kierunek migracji DNA w żelu, biegun dodatni i ujemny; opisać poszczególne ścieżki tj. wskazać ścieżkę z plazmidem wzorcowym, opisać różne formy plazmidowego DNA plazmidu wzorcowego, wskazać ścieżkę z własną próbą).
5. Porównać rozdział i formy oczyszczonego na ćwiczeniach plazmidu z preparatem wzorcowym. Czy wyniki rozdziału preparatu DNA uzyskanego na ćwiczeniach i próby wzorcowej są zgodne? Której z form plazmidowego DNA jest najwięcej? Dlaczego? Czy występują artefakty (dodatkowe prążki, niewystępujące w próbie wzorcowej), dodatkowe plamy lub zanieczyszczenia? Jeśli tak to dlaczego?
6. Zinterpretować wynik własnej próby – stwierdzić czy udało się wyizolować plazmidowe DNA, jeśli tak to wskazać które formy plazmidowego DNA, są widoczne na obrazie elektroforetycznym (porównać obraz rozdziału elektroforetycznego z wzorcowym plazmidowym DNA).

2. ELEKTROFOREZA BIAŁEK I REAKCJE CHARAKTERYSTYCZNE AMINOKWASÓW

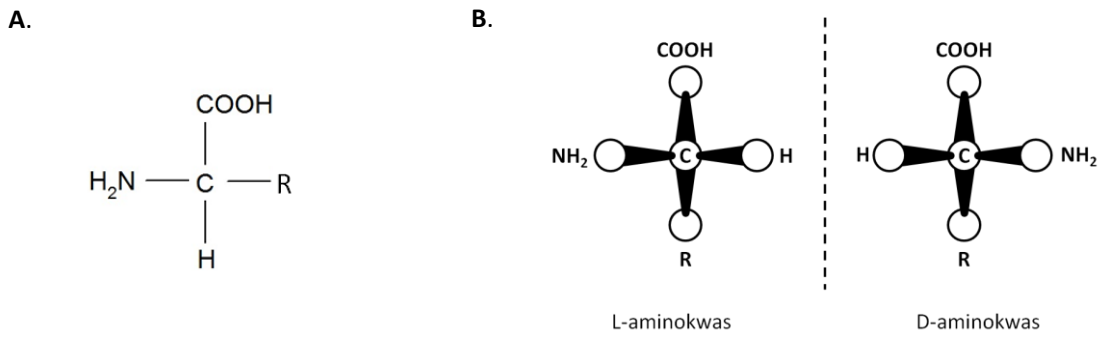
I. ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- ✓ Aminokwasy: budowa chemiczna – wzory strukturalne, podział uwzględniający rożną polarność grup funkcyjnych, jony obojnacze, punkt izoelektryczny, aktywność optyczna.
- ✓ Wiązanie peptydowe: cechy wiązania, ugrupowania zaangażowane w jego tworzenie, umiejętność narysowania wiązania peptydowego pomiędzy dowolnymi aminokwasami.
- ✓ Białka: skład i wielkość, struktura I, II, III i IV-rzędowa, klasyfikacja białek na podstawie ich funkcji.
- ✓ Reakcje charakterystyczne aminokwasów i białek.
- ✓ Elektroforeza: istota procesu, ograniczenia oraz zastosowania tej metody, typy elektroforezy.
- ✓ Dokładna znajomość części doświadczalnej oraz umiejętność sprawnego przeliczania stężeń.

II. WSTĘP

Białka są polipeptydami złożonymi z określonej ilości reszt aminokwasowych (Rys. 1A), połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi.

Typowy α-aminokwas jest zbudowany z centralnie usytuowanego atomu węgla, określanego jako węgiel α (Cα), połączonego z pierwszorzędową grupą aminową ($-NH_2$), grupą karboksylową (-COOH), atomem wodoru (H) i łańcuchem bocznym (R). Wyjątkiem jest prolina, która zawiera drugorzędową grupę aminową (jest to tzw. α-iminokwas). Cztery różne podstawniki połączone z tetraedrycznym atomem węgla α nadają α-aminokwasom charakter chiralny, tzn. że cząsteczki aminokwasów mogą występować w postaci jednego z dwóch nienakładających się na siebie lustrzanych odbić nazwanych **enancjomerami** (rys. 1B). Wyjątek stanowi glicyna, która jest achiralna, gdyż jej Cα jest związany z dwoma atomami wodoru.

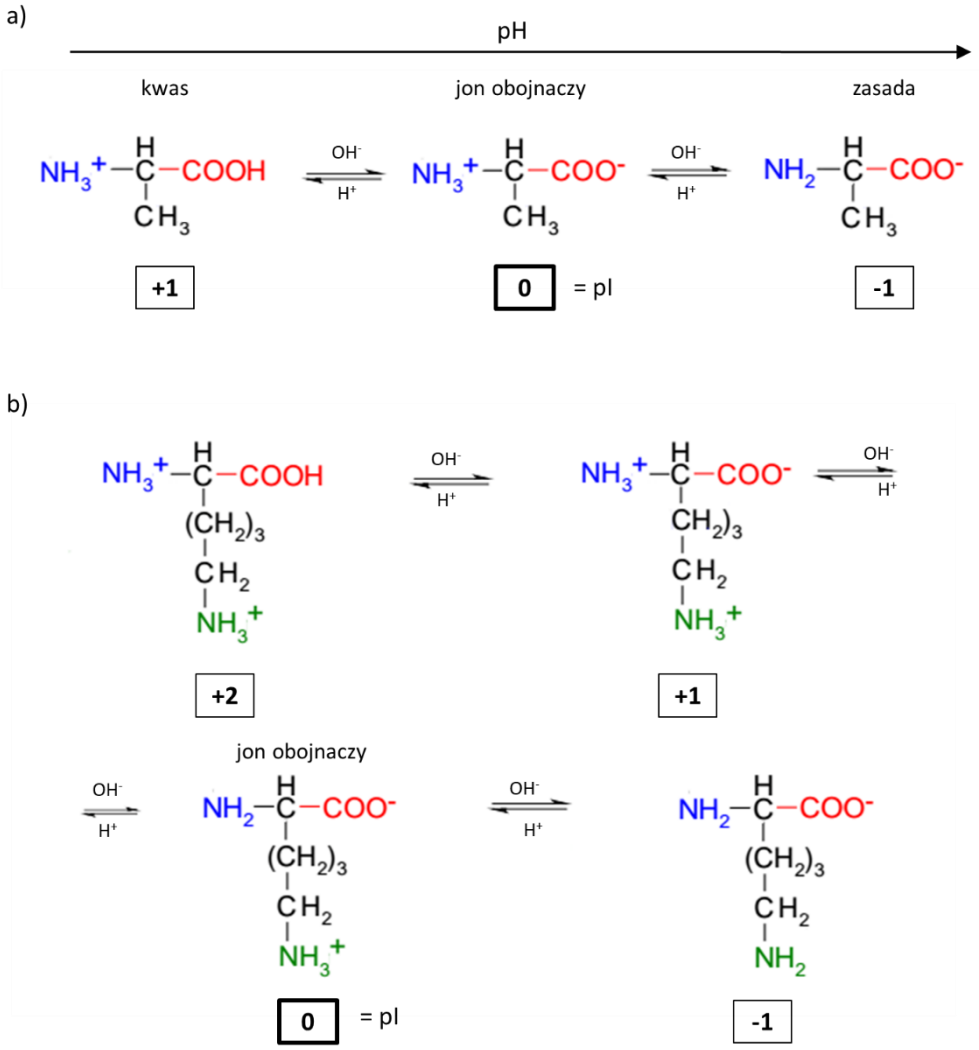


Rys. 1 (A) Ogólny wzór aminokwasu. (B) Enancjomery L i D aminokwasów; R- charakterystyczna grupa, tzw. łańcuch boczny aminokwasu.

Białka zbudowane są wyłącznie z L-aminokwasów. D-aminokwasy wstępują rzadko i można je znaleźć w ścianie komórkowej bakterii oraz w niektórych antybiotykach.

Wyróżnia się 20 podstawowych aminokwasów, różniących się strukturą łańcucha bocznego (grupy R), a tym samym wielkością, kształtem, ładunkiem elektrycznym, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych, hydrofobowością oraz reaktywnością chemiczną. Łańcuch boczny może zawierać dodatkowo grupy aminowe, karboksylowe, karboksyamidowe, tiolowe, tioeterowe, hydroksylowe lub pierścienie aromatyczne.

W zależności od pH środowiska zmienia się stan jonizacji cząsteczki aminokwasu. Jonizacji może ulegać grupa aminowa ($-NH_3^+$) oraz grupa karboksylowa ($-COO^-$) przy centralnym atomie węgla, a w przypadku Asp, Glu, Arg, Lys, His, Cys, Tyr, także dodatkowa grupa w łańcuchu bocznym. Spadek pH prowadzi do dejonizacji grupy karboksylowej (protonacja), natomiast wzrost pH prowadzi do dejonizacji grupy aminowej (deprotonacja) (rys. 2).

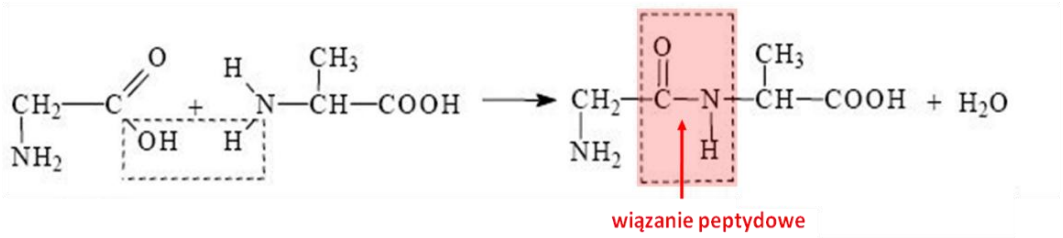


Rys. 2. Własności kwasowo zasadowe aminokwasów; a) jonizacja waliny, jako przykład aminokwasu zawierającego tylko dwie grupy ulegające jonizacji, b) jonizacja lizyny, przykład aminokwasu zawierającego oprócz dwóch podstawowych grup ulegających jonizacji, jeszcze jedną dodatkową grupę, znajdującą się w łańcuchu bocznym. Czerwonym kolorem zaznaczono grupę α-karboksylową, niebieskim grupę α-aminową, zielonym grupę aminową w łańcuchu bocznym; w kwadratach zaznaczono wypadkowy ładunek cząsteczki aminokwasu. Punkt izoelektryczny (pI) jest to takie pH, przy którym wypadkowy ładunek cząsteczki równa się zero.

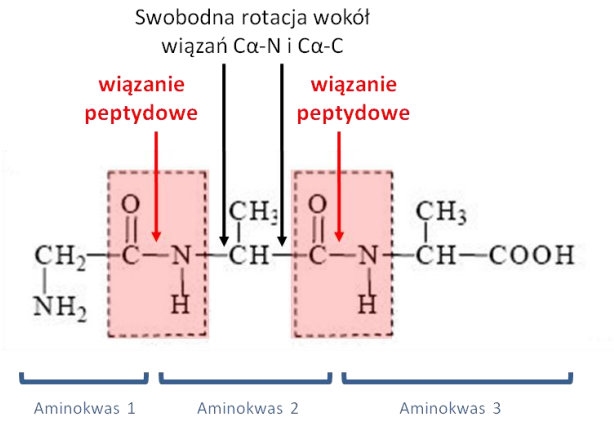
Wartość pH roztworu, przy którym stężenie jonu obojnaczego (cząsteczki zawierającej tą samą ilość protonowanych grup aminowych co deprotonowanych grup karboksylowych) osiąga maksymalną wartość, natomiast stężenia form: anionowej i kationowej mają jednakową, minimalną wartość (wypadkowy ładunek całkowity wynosi zero), nazywamy **punktem izoelektrycznym (pI)**. W pH poniżej pI cząsteczki mają wypadkowy ładunek dodatni, zaś powyżej ich wypadkowy ładunek jest ujemny.

Własności chemiczne wspólne wszystkim aminokwasom są uwarunkowane obecnością grupy karboksylowej i aminowej. Natomiast różnice w budowie łańcucha bocznego decydują o specyficznych własnościach fizykochemicznych i reaktywności aminokwasów. Dzięki temu niektóre aminokwasy dają charakterystyczne reakcje barwne, umożliwiające ich wykrywanie nawet w mieszaninie z innymi aminokwasami.

Poszczególne aminokwasy w białku są połączone **wiązaniami peptydowymi** (zwanym także amidowym), które powstają między grupą α-karboksylową jednego aminokwasu i grupą α-aminową następnego aminokwasu (rys. 3). Wiązanie peptydowe jest płaskie, tzn. sześć atomów znajduje się w tej samej płaszczyźnie: atom Cα i grupa CO z pierwszego aminokwasu oraz grupa NH i Cα z drugiego aminokwasu. Stąd też wiązanie peptydowe ma w znacznym stopniu charakter wiązania podwójnego, co zapobiega rotacji wokół niego. Swobodna rotacja jest możliwa wokół wiązań Cα-N oraz Cα-C, czyli po obu stronach wiązania peptydowego, co umożliwia ustawienie sąsiednich grup peptydowych pod różnym kątem (rys. 4). Ze względu na sferyczne dopasowanie grup połączonych z Cα, wiązanie peptydowe prawie zawsze występuje w konfiguracji ***trans*** (wodór z grupy aminowej znajduje się w położeniu przeciwstawnym względem tlenu grupy karbonylowej). Forma cis, występuje częściej tylko w wiązaniach peptydowych w połączeniu z proliną.



Rys. 3. Wiązanie peptydowe charakterystyczne dla peptydów i białek występujące między grupą α-karboksylową jednego aminokwasu i grupą α-aminową kolejnego aminokwasu, czemu towarzyszy wydzielenie cząsteczki wody.



Rys. 4. Wiązanie peptydowe jest płaskie i ma charakter wiązania podwójnego, co zapobiega rotacji wokół niego. Swobodna rotacja jest możliwa wokół wiązań Cα-N oraz Cα-C, czyli po obu stronach wiązania peptydowego, co umożliwia ustawienie sąsiednich grup peptydowych pod różnym kątem (zginanie łańcucha polipeptydowego).

Aminokwasy połączone wiązaniami peptydowymi tworzą łańcuch oligopeptydowy (do 25 połączonych ze sobą aminokwasów) lub polipeptydowy (powyżej 25 połączonych ze sobą aminokwasów). Jednostkę aminokwasu wbudowaną w ten łańcuch nazywamy resztą aminokwasową. Łańcuch aminokwasowy jest spolaryzowany , ponieważ ma różne końce – na jednym końcu znajduje się grupa α-aminowa (koniec N) a na drugim α-karboksylowa (koniec C). Jako początek łańcucha polipeptydowego umownie przyjęto jego koniec aminowy.

W łańcuchu polipeptydowym jonizacji ulęgają tylko łańcuchy boczne oraz końcowa grupa aminowa i karboksylowa. Punkt izoelektryczny polipeptydu wyznacza pH, przy którym suma ładunków dodatnich równa się sumie ładunków ujemnych (wypadkowa ładunków wynosi zero).

Białka wchodzą w skład każdej komórki i płynów ustrojowych, odgrywając istotną rolę niemal we wszystkich procesach biologicznych. Dzięki białkom m.in. jest możliwa przemiana materii i energii oraz regulacja tej przemiany, transport różnego rodzaju związków i jonów. Białka też uczestniczą w procesach krzepnięcia krwi i likwidacji ubytków tkankowych oraz decydują o właściwościach odpornościowych organizmu.

W związku ze złożoną strukturą białek, wprowadzono pojęcie rzędowości ich struktury (Linderstrom-Lang, 1952). Liniowa sekwencja aminokwasów połączonych wiązaniem peptydowym, czyli kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym jest nazywana pierwszorzędową strukturą białka. Struktura drugorzędowa odnosi się do regularnego pofałdowania rejonów łańcucha polipeptydowego. Najczęściej występującymi typami struktury drugorzędowej są: helisa α i harmonijka β. Struktura drugorzędowa stabilizowana jest przez wiązania wodorowe pomiędzy tlenem karbonylowym jednego wiązania peptydowego a wodorem grupy aminowej innego wiązania peptydowego. W α-helisie wiązania wodorowe tworzą się w obrębie tego samego łańcucha polipeptydowego, regularnie, pomiędzy oddalonymi od siebie o cztery reszty aminokwasowe wiązaniami peptydowymi. W β-harmonijce wiązania wodorowe powstają między wiązaniami peptydowymi różnych łańcuchów polipeptydowych lub różnych części tego samego łańcucha. Łańcuchy te mogą być ułożone równolegle (w tym samym kierunku) lub antyrównolegle (w przeciwnym kierunku, na przemian). Struktura trzeciorzędowa oznacza wzajemne ułożenie w przestrzeni elementów struktury drugorzędowej. Odpowiada ona natywnej, biologicznie aktywnej konformacji białka. Wynika ona z sekwencji aminokwasów w łańcuchu i jest utrzymywana dzięki oddziaływaniom hydrofobowym, siłom elektrostatycznym (wiązania jonowe między przeciwstawnie naładowanymi grupami, słabe oddziaływania van der Waalsa miedzy ściśle upakowanymi alifatycznymi łańcuchami bocznymi we wnętrzu białka), wiązaniom wodorowym i kowalencyjnym (wiązania disiarczkowe pomiędzy dwoma resztami cysteiny, tworzącymi cystynę). Struktura czwartorzędowa dotyczy białek zbudowanych z co najmniej dwóch łańcuchów polipeptydowych i oznacza przestrzenne ułożenie podjednostek polipeptydowych, z których każda składa się ze sfałdowanego do trzeciorzędowej struktury łańcucha polipeptydowego. Struktura czwartorzędowa może być stabilizowana przez wiązania kowalencyjne (np. wiązania disiarczkowe) lub oddziaływania niekowalencyjne (siły elektrostatyczne, wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe).

Białka ze względu na swoją złożoną budowę, a przede wszystkim strukturę czwartorzędową, ulegają łatwo zmianom przestrzennym, wykazując allosteryczność. Allosteryczność odgrywa istotną rolę w przypadku katalizy enzymatycznej (więcej na ten temat w rozdziale 4 i 5).

Własności chemiczne wspólne wszystkim aminokwasom są uwarunkowane obecnością grupy karboksylowej i aminowej. Natomiast różnice w budowie łańcucha bocznego decydują o specyficznych własnościach fizykochemicznych i reaktywności aminokwasów. Dzięki temu niektóre aminokwasy dają charakterystyczne reakcje barwne, umożliwiające ich wykrywanie nawet w mieszaninie z innymi aminokwasami. Białka oprócz reakcji charakterystycznych dla łańcuchów bocznych wchodzących w ich skład aminokwasów mogą dawać specyficzne reakcje dzięki obecności wiązań peptydowych.

Reakcje charakterystyczne aminokwasów i białek

a. **Reakcja na obecność cysteiny i cystyny** – aminokwasy z grupami -SH (cysteina) lub S-S (cystyna) (zarówno w stanie wolnym, jak i związanym w białkach) podczas ogrzewania w środowisku silnie zasadowym, przekształcając się w kwas pirogronowy, uwalniają siarkę w postaci jonów siarczkowych. Jony siarczkowe reagują z jonami ołowiu, dając czarny osad siarczku ołowiu (PbS). Dodatkowym produktem reakcji jest amoniak. Metionina nie daje dodatniego wyniku tej reakcji.

b. **Reakcja ksantoproteinowa** - aminokwasy zawierające pierścień aromatyczny (fenyloalanina, tryptofan i tyrozyna) zarówno wolne, jak i związane w białku ulegają nitrowaniu podczas ogrzewania ze stężonym kwasem azotowym. Żółte pochodne nitrowe w środowisku zasadowym tworzą sole o intensywnym zabarwieniu pomarańczowym.

c. **Reakcja Hopkinsa i Cole'a** - reakcja na obecność układu indolowego (w tryptofanie). W środowisku kwaśnym tryptofan reaguje z aldehydami (np. kwasem glioksalowym) dając barwny produkt kondesacji. W kwaśnych hydrolizatach peptydów i białek wynik reakcji jest ujemny, ponieważ podczas kwaśnej hydrolizy tryptofan ulega zniszczeniu.

d. **Reakcja na obecność histydyny** - pierścień imidazolowy histydyny w środowisku zasadowym ulega sprzęganiu z jonem p-sulfobenzodiazoniowym. Produktem reakcji jest pomarańczowy barwnik azowy.

e. **Reakcja ninhydrynowa -** służy do wykrywania wolnych aminokwasów (peptydy i białka dają bardzo słaby odczyn). W pH>4 aminokwasy pod wpływem ninhydryny ulegają najpierw utlenieniu a następnie dekarboksylacji i deaminacji. W obecności powstałego amoniaku zredukowana cząsteczka ninhydryny ulega kondesacji z utlenioną cząsteczką ninhydryny i powstaje charakterystyczny fioletowoniebieski produkt. Natężenie zabarwienia jest proporcjonalne do stężenia aminokwasu. W przypadku aminokwasów - proliny i hydroksyproliny, które nie zawierają grupy α- aminowej produkt reakcji kondensacji ma barwę żółtą.

f. **Reakcja biuretowa** - pozwala na odróżnienie białek od aminokwasów. W środowisku zasadowym następuje tautomeryzacja grup przy wiązaniu peptydowym (-CO-NH- → -C(OH)=N-). Z sąsiadującymi ze sobą ugrupowaniami tego typu jony miedziowe tworzą kompleksy o barwie fioletowej. Wolne aminokwasy tworzą również kompleksy z jonami miedziowymi, ale produkty takiej reakcji mają barwę niebieską.

Elektroforeza białek

Dzięki obecności grup dysocjujących aminokwasy i białka posiadają ładunek elektryczny, co jest podstawą ich rozdziału w procesie elektroforezy. Elektroforeza polega na ruchu naładowanych cząsteczek umieszczonych w polu elektrycznym w środowisku przewodzącym w kierunku odpowiednich elektrod. Szybkość migracji białka w polu elektrycznym zależy od natężenia pola elektrycznego, wypadkowego ładunku cząsteczki i współczynnika tarcia.

Elektroforezę białek można przeprowadzić w żelach poliakrylamidowych (ang. *PAGE- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), które działają jak sito molekularne. Cząsteczki o wymiarach małych w stosunku do wielkości porów żelu migrują łatwo, natomiast bardzo duże cząsteczki pozostają prawie nieruchome. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym zawierającym SDS (SDS-PAGE) umożliwia rozdział białek na podstawie różnic w ich masach cząsteczkowych. Białka przed naniesieniem w studzienki żelu denaturuje się poprzez dodanie SDS-u i czynnika redukującego. SDS (sól sodowa siarczanu dodecylu) jest anionowym detergentem, który zrywa prawie wszystkie wiązania niekowalencyjne występujące w białku oraz wiąże się z białkami nadając im wypadkowy ładunek ujemny, proporcjonalny do masy cząsteczkowej. Wiązania dwusiarczkowe są zrywane dzięki działaniu czynnika redukującego (β-merkaptoetanol lub ditiotretiol). Ruchliwość elektroforetyczna jest liniowo odwrotnie proporcjonalna do logarytmu masy: białka o mniejszej masie cząsteczkowej migrują szybciej.

Najczęściej stosowaną metodą detekcji białek w żelach poliakryloamidowych jest barwienie kwaśnym alkoholowym roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250. Zastosowanie kwaśnego alkoholowego roztworu powoduje utrwalenie białek w żelu, co zapobiega ich wymywaniu. W wiązaniu barwnika z białkami uczestniczą wiązania van der Waalsa i wiązania jonowe. Dzięki tej metodzie można wykryć 0,1-1 µg białka. Znacznie czulszą metodą jest barwienie przy użyciu $AgNO_3$.

SDS-PAGE jest szeroko stosowaną techniką rozdziału białek. Można ją stosować m. in. do badania czystości preparatu lub wyznaczania masy cząsteczkowej białek.

Informacje uzupełniające: https://www.youtube.com/watch?v=i_6y6Z5UvwE

III. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

1. Aparat do elektroforezy poliakryloamidowej białek z kompletem szklanych płytek, przekładek i grzebieniem
2. Zasilacz prądu stałego
3. Plastikowe pudełko do barwienia żelu
4. Mikropipety automatyczne: 20-200 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl (1 komplet / grupa / stanowisko do przygotowania żelu).
5. Końcówki do pipet automatycznych
6. Rękawiczki
7. Pipety szklane (5 ml 2 szt./zestaw) + tubus pipet 5 ml przy stanowisku do wylewania żeli
8. Zlewki (3 szt. przy stanowisku do wylewania żeli)
9. Probówki (20 ml- 20 szt.)
10. Lignina
11. Łaźnia wodna
12. Łapy
13. Pipety pasterowskie
14. Zapalniczka, okulary ochronne

IV. ODCZYNNIKI

1. 30 % roztwór akryloamidów (29.2 % akryloamid i 0.8 % metyleno-bis-akryloamid)
2. 1,5 M Tris (pH 8,8)
3. 1 M Tris (pH 6,8)
4. 10 % SDS
5. 10 % nadsiarczan amonu
6. TEMED (N, N, N', N' Tetrametylenodiamina)
7. Roztwór Coomassie Brilliant Blue R-250: 0,25 g Coomassie rozpuścić w 125 ml metanolu, dodać 100 ml H_2O i 25 ml kwasu octowego
8. Roztwór odbarwiacza: metanol: kwas octowy: H_2O (stosunek obj. 2:1:7)
9. Bufor elektrodowy (10 x): Tris- 15,125 g, glicyna- 72 g, SDS- 5 g/ 0,5 L H_2O
10. Bufor do lizy białek (2 x) (przechowywać w-20°C): 1 M Tris-HCl (pH 6,8) – 1,5 ml; 10 % SDS – 4,8 ml; 87 % glicerol – 2,76 ml; β-merkaptoetanol – 1,2 ml; H_2O - 13,74 ml; błękit bromofenolowy
11. 0,1 % acetonowy roztwór ninhydryny
12. 1%-owe roztwory wodne aminokwasów: glicyny, cystyny, cysteiny, fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu i histydyny
13. Surowica krwi bydlęcej (10 x rozc.)
14. 1 % wodny roztwór żelatyny
15. 6 N roztwór wodorotlenku sodu
16. Kwas azotowy (stężony)
17. Kwas siarkowy (stężony)

18. 0,5 % roztwór siarczanu miedzi
19. 2 % roztwór octanu ołowiawego
20. Roztwór kwasu glioksalowego w 2,5 % kwasie octowym
21. 5 % roztwór azotynu sodu
22. 1 % roztwór kwasu sulfanilowego w 1 N HCl
23. 10 % roztwór węglanu sodu
24. Alkohol izopropylowy

V. WYKONANIE ĆWICZENIA

Elektroforeza białek

Przygotowanie żelu poliakryloamidowego

Przygotować żel rozdzielający, dolny: wymieszać roztwory wg Tabeli 1 i wlać mieszaninę między szklane płytki (katalizatory polimeryzacji: nadsiarczan amonu i TEMED dodać tuż przed wlaniem mieszaniny między płytki szklane). Roztworu powinno być tyle, aby pozostało miejsce na grzebień i żel górny (ok. 1 cm wysokości). Na żel nawarstwić ostrożnie 0,2-0,5 ml wody (aby uniemożliwić dostęp tlenu - inhibitora polimeryzacji) i pozostawić do polimeryzacji na ok. 10-15 min. W tym czasie przygotować żel zagęszczający, górny wg Tabeli 2 (nadsiarczan i TEMED dodać tuż przed wlaniem żelu między płyty).

Tabela 1. Skład żelu rozdzielającego (dolnego).

Składnik	Ilość [ml]
H_2O	3,3
30 % roztwór akrylamidów	4,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10 % SDS	0,1
10 % nadsiarczan amonu	0,1
TEMED	0,004
Objetość całkowita	10

Tabela 2. Skład żelu zagęszczającego (górnego).

Składnik	Ilość [ml]
H_2O	2,1
30 % roztwór akrylamidów	0,5
1M Tris (pH 6,8)	0,38
10 % SDS	0,03
10 % nadsiarczan amonu	0,03
TEMED	0,003
Objetość całkowita	3

Po spolimeryzowaniu żelu dolnego wodę należy usunąć i wlać roztwór żelu górnego. Natychmiast włożyć grzebień tak, aby nie pozostawić pęcherzy powietrza w żelu. Po spolimeryzowaniu żelu wyjąć grzebień i umieścić płyty w aparacie do elektroforezy. Górny i dolny zbiornik aparatu wypełnić buforem elektrodowym (1x stężonym). Aparat podłączyć do zasilacza (górny zbiornik do katody [-], dolny do anody [+]).

Po przepłukaniu studzienek buforem elektrodowym nanieść przygotowane wcześniej próby (objętość ustalić z prowadzącym ćwiczenie).

Przygotowanie prób do elektroforezy i rozdział elektroforetyczny

Do próby (osad, ekstrakt bakteryjny lub oczyszczone białko) dodać równą objętość buforu do lizy (2x stężony), probówkę umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 5 min. Próby odwirować (5.000 obr./min, 30 sec) i nanieść do studzienek w żelu. Włączyć zasilacz i prowadzić rozdział elektroforetyczny przy 100 V do momentu, gdy czoło barwnika znajdzie się na granicy żelu górnego i dolnego. Następnie zwiększyć napięcie do 150-180 V. Elektroforezę zakończyć, gdy barwnik będzie znajdował się przy końcu żelu.

Wizualizacja białek rozdzielonych w żelu poliakryloamidowym roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250

Żel inkubować z wytrząsaniem w roztworze Coomassie przez ok. 30 min. Następnie żel odbarwiać w roztworze metanol : kwas octowy : H_2O (w stosunku obj. 2:1:7) do uzyskania wyraźnych prążków. W odbarwiaczu można umieścić kawałek gąbki, która będzie pochłaniała barwnik.

Reakcje charakterystyczne aminokwasów

a. Reakcja na obecność cysteiny i cystyny

Do sześciu ponumerowanych probówek odmierzyć kolejno po 100 µl roztworów: (1) cystyny, (2) cysteiny, (3) glicyny, (4) żelatyny, (5) surowicy krwi oraz (6) próby X, a następnie do wszystkich probówek dodać po 4 krople 6N NaOH i po kropli octanu ołowiawego. Ogrzewać przez kilka minut we wrzącej łaźni wodnej.

b. Reakcja na obecność pierścienia aromatycznego (ksantoproteinowa)

Do ośmiu ponumerowanych probówek odmierzyć po 2 krople stężonego kwasu azotowego, a następnie dodać po 100 µl roztworów (1) glicyny, (2) fenyloalaniny, (3) tyrozyny, (4) tryptofanu, (5) cysteiny, (6) żelatyny, (7) surowicy krwi oraz (8) próby X. Probówki ogrzewać nad palnikiem do chwili wydzielania się brązowych par tlenku azotu (OSTROŻNIE, otwór probówki skierować od siebie). Po ostygnięciu do każdej probówki dodać powoli kroplami, mieszając, po około 1,5 ml 6N roztworu NaOH (OSTROŻNIE reakcja egzotermiczna!).

c. Reakcja na obecność tryptofanu (Hopkins'a i Cole'a)

Do pięciu ponumerowanych probówek odmierzyć po 200 µl roztworów: (1) glicyny, (2) tryptofanu, (3) żelatyny, (4) surowicy krwi oraz (5) próby X. Do wszystkich probówek dodać po 2 krople roztworu kwasu glioksalowego, a następnie do każdej probówki dodawać ostrożnie stężony kwas siarkowy po ściance próbówki, nie mieszając. Objętość dodanego kwasu powinna być zbliżona do objętości roztworu wodnego w probówce. Należy zwrócić uwagę na zabarwienie na granicy obu warstw.

d. Reakcja na obecność histydyny

Do pięciu ponumerowanych probówek odmierzyć po 100 µl roztworów: (1) glicyny, (2) histydyny, (3) żelatyny (4) surowicy krwi oraz (5) próby X. Do wszystkich probówek dodać po 100 µl świeżo przyrządzonej mieszaniny równych objętości roztworu azotynu sodu i roztworu kwasu sulfanilowego, a następnie po 200 µl roztworu węglanu sodu.

e. Reakcja ninhydrynowa

Do pięciu ponumerowanych probówek odmierzyć po 100 µl roztworów: (1) glicyny, (2) żelatyny, (3) surowicy krwi, (4) wody destylowanej oraz (5) próby X. Następnie do wszystkich probówek dodać po 100 µl roztworu ninhydryny i wstawić je na kilka minut do łaźni wodnej o temperaturze 100°C.

f. Reakcja biuretowa

Do siedmiu ponumerowanych probówek odmierzyć po 100 µl: (1) wody destylowanej, (2) roztworu BSA, (3) glicyny, (4) histydyny, (5) żelatyny, (6) surowicy krwi oraz (7) próby X. Następnie do wszystkich probówek dodać 4 krople 6N NaOH i po jednej kropli roztworu $CuSO_4$.

VI. WYNIKI I WNIOSKI - SPRAWOZDANIE:

1. Temat ćwiczenia
2. Cel
3. Opisać wynik rozdziału elektroforetycznego białek w żelu poliakryloamidowym (zaznaczyć kierunek migracji białek w żelu, biegun dodatni i ujemny, podpisać poszczególne ścieżki).
4. Wyjaśnić zasadę rozdziału białek w żelu (wg jakiego parametru rozdzielane są białka - rola poszczególnych składników w buforze lizującym i w żelu polakrylamidowym).
5. Wyjaśnić co przedstawia dowolny prążek na obrazie elektroforetycznym.
6. Opisać wyniki dla każdej reakcji charakterystycznej w karcie obserwacji i wyników: w odpowiednie rubryki wpisać roztwory traktowane jako kontrola ujemna (K-) i kontrola dodatnia (K+), opisać wyniki dla tych prób, zwrócić uwagę na ich zgodność z wiedzą teoretyczną. Opisać obserwacje dla żelatyny i surowicy krwi. Opisać obserwacje dla próby X.
7. Na podstawie obserwacji wyciągnąć wnioski dotyczące obecności/braku danego aminokwasu/białka w roztworze żelatyny i surowicy krwi oraz zidentyfikować roztwór w próbie X.

Próba X zawiera:…….

W roztworze żelatyny wykryto obecność:…….

W roztworze surowicy krwi wykryto obecność: …….

Karta obserwacji i wyników:

Reakcja (nazwa)	Kontrola ujemna (K-)	Kontrola dodatnia (K+)	Żelatyna	Surowica krwi	Próba X	Wnioski/uwagi

3. CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA NA ŻELU SEPHADEX G-75

I. ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA:

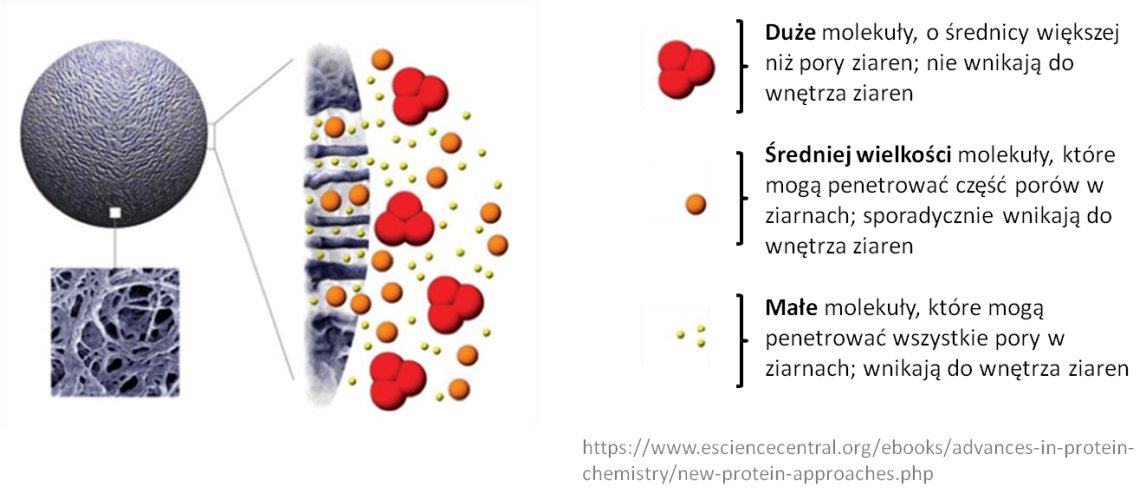
- ✓ Technika chromatografii kolumnowej (formowanie i równoważenie kolumny, nanoszenie próby, rozwijanie chromatogramu, regulacja przepływu rozpuszczalników).
- ✓ Sączenie molekularne: charakterystyka żeli typu Sephadex, inne rodzaje żeli filtracyjnych m.in. Sepharose, Sephacryl, mechanizm sączenia molekularnego, pojęcia charakteryzujące stosowaną w doświadczeniu kolumnę chromatograficzną oraz zachowanie się rozdzielanych związków (V_t, V_0, V_i, V_g, V_e, K_d, K_{av}), zastosowanie metody sączenia molekularnego.
- ✓ Inne rodzaje metod chromatograficznych (chromatografia jonowymienna, powinowactwa, oddziaływań hydrofobowych i fazy odwróconej): mechanizm oraz zalety i ograniczenia każdej z chromatografii.
- ✓ Budowa związków rozdzielanych na żelu Sephadex G-75 (Blue Dextran, cytochrom c, dwuchromian potasu).
- ✓ Dokładna znajomość części doświadczalnej oraz umiejętność sprawnego przeliczania stężeń.

II. WSTĘP

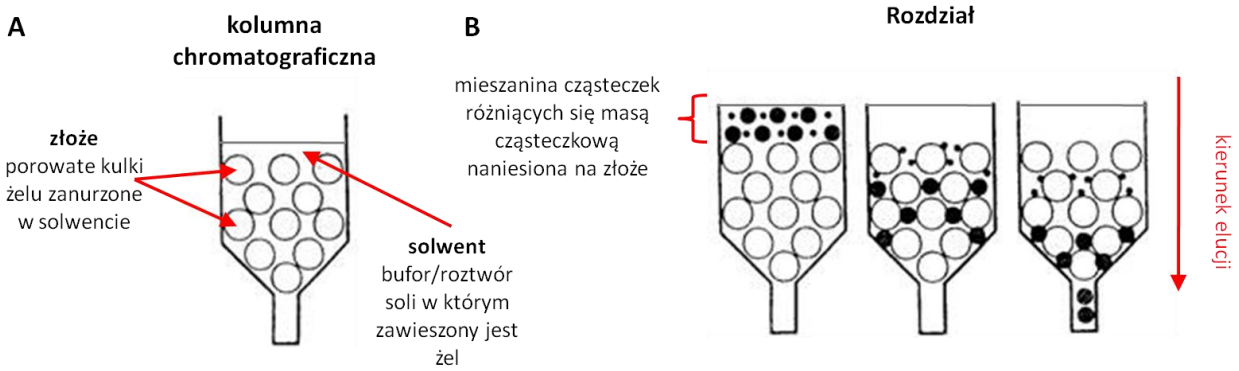
Chromatografia na żelu Sephadex, określana też jako sączenie molekularne, jest techniką umożliwiającą analityczny bądź preparatywny rozdział substancji różniących się masą cząsteczkową.

Sephadex jest handlową nazwą preparatu uzyskiwanego przez wytworzenie wiązań poprzecznych pomiędzy łańcuchami dekstranu. Preparaty żelu, mające postać granulek o średnicy 10-300 µm w zależności od stopnia usieciowania, różnią się zdolnością wchłaniania wody, co służy za kryterium ich podziału i decyduje o rozdzielczych właściwościach żelu.

Separacja makrocząsteczek przy zastosowaniu techniki <u>filtracji żelowej</u> polega na wykorzystaniu porowatej struktury ziaren żelu oraz zjawiska dyfuzji, któremu podlegają zarówno molekuły solwentu, jak i separowane makromolekuły. Duże cząsteczki takie jak np. Blue Dextran, które są większe niż pory napęczniałych ziaren żelu nie mogą penetrować do ich wnętrza, a więc przechodzą wyłącznie poprzez fazę wodną złoża i są eluowane jako pierwsze. Mniejsze cząsteczki z kolei wnikają w rożnym stopniu do wnętrza ziaren (w zależności od swego kształtu i rozmiaru) i są eluowane w kolejności zmniejszania się ich masy cząsteczkowej (tj. w pierwszej kolejności eluowane będą cząsteczki o największej masie/kształcie/rozmiarze, następnie średnim a na końcu najmniejszym) (rys. 1, 2, 4).



Rys. 1. Schemat przedstawiający wnikanie makromolekuł w pory żelu, w zależności od ich wielkości



Rys. 2. A) Schemat przedstawiający kolumnę chromatograficzną z upakowanym złożem. B) schemat rozdziału cząsteczek o rożnej masie cząsteczkowej.

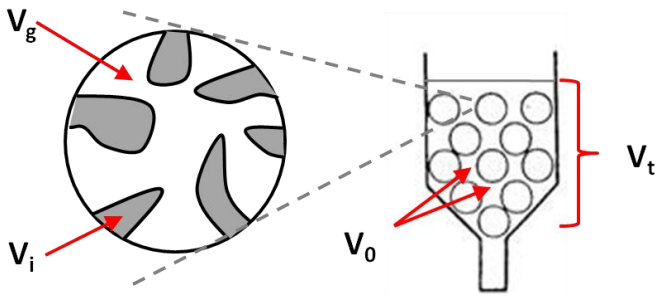
Charakteryzując kolumnę chromatograficzną oraz zachowanie się rozdzielonych substancji, stosuje się następujące pojęcia (rys. 3):

- objętość swobodna (zerowa) (V_0) – objętość rozpuszczalnika znajdującego się pomiędzy ziarnami żelu
- objętość wewnętrzna (V_i) - objętość rozpuszczalnika wypełniającego ziarna żelu
- objętość matrycy żelu (V_g)
- objętość całkowita złoża (V_t)

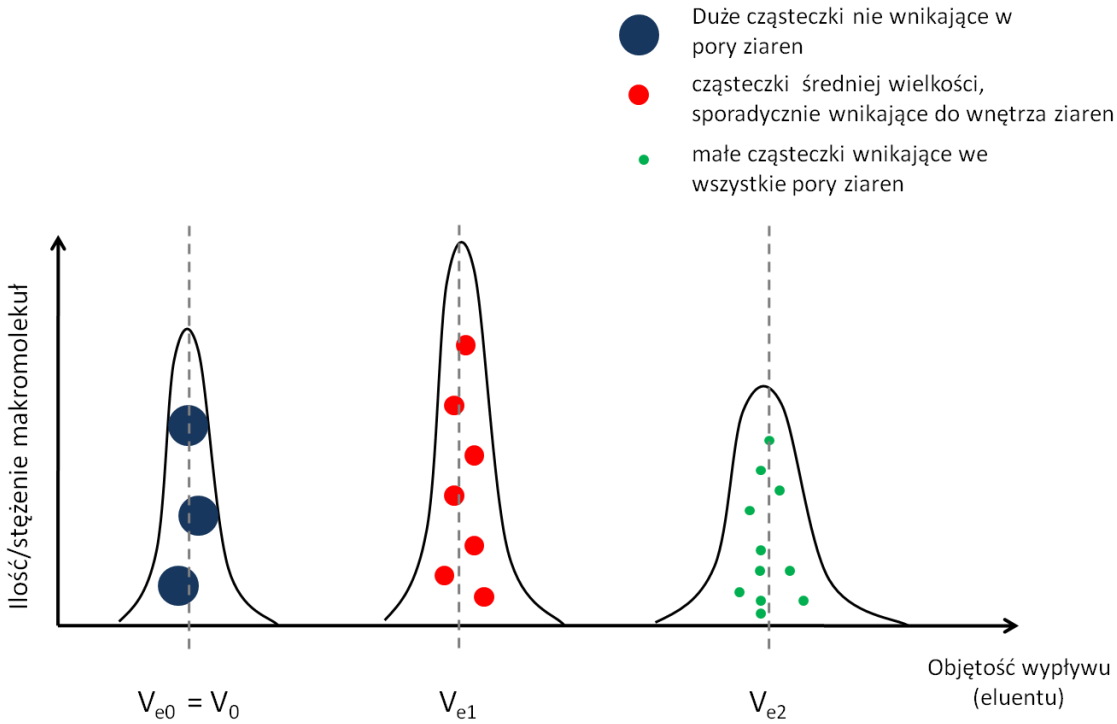
$$V_t = V_0 + V_i + V_g$$

oraz

- objętość elucyjna (V_e), charakterystyczna dla danej substancji.



Rys. 3. Objętości charakteryzujące kolumnę chromatograficzną.



Rys. 4. Wykres wypływu (elucji) ilustrujący rozdział makromolekuł o różnych rozmiarach cząsteczkowych. Duże cząsteczki nie wnikają do wnętrza ziaren, przepływają przez kolumnę najszybciej i jako pierwsze pojawiają się u wylotu kolumny (np. **dekstran 2000 kDa**). Ich objętość elucyjna równa się objętości swobodnej V_0. Cząsteczki średniej wielkości, których rozmiar pozwala sporadycznie wniknąć do wnętrza ziaren, wypłyną z kolumny na pozycji pośredniej (np. **cytochrom c - 13 kDa**), a ich objętość elucyjna równa się V_{e1}. Małe cząsteczki, które wnikają do wnętrza ziaren, zatem mają do pokonania najdłuższą i krętą drogę, wypływają z kolumny jako ostatnie (np. **dwuchromian potasu** - 0,3 kDa), a ich objętość elucyjna równa się V_{e2}. $V_0 < V_{e1} < V_{e2}$

Rozpatrując sączenie molekularne na żelu jako szczególny przypadek chromatografii podziałowej, stosujemy zależność pomiędzy objętością elucyjną substancji (V_e) a charakterystycznym dla danej substancji współczynnikiem podziału między fazę stacjonarną i ruchomą:

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

gdzie: K_d - współczynnik podziału,
V_0 - faza ruchoma
V_i - faza stacjonarna

W chromatografii na żelu stosuje się dwa różne współczynniki podziału, w zależności od zdefiniowania fazy stacjonarnej.

Jeżeli jako fazę stacjonarną traktuje się rozpuszczalnik związany z żelem /Vi/ uzyskujemy zależność:

$$K_d = V_e - V_0/V_i$$

W praktyce trudno jednak ustalić V_i, w związku z tym jako fazę stacjonarną przyjmujemy całą fazę żelową tzn. (V_i+V_g):

$$K_{av} = (V_e - V_0)/ (V_t - V_0)$$

Wartość K_{av} (współczynnik dostępności) jest łatwiejsza do wyznaczenia, stąd też częściej jest stosowana w praktyce.

W pracy laboratoryjnej sączenie molekularne wykorzystuje się do:

- rozdziału substancji różniących się masą cząsteczkową,
- odsalania substancji wielkocząsteczkowych,
- wyznaczania ciężaru cząsteczkowego związków.

III. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

1. Kolumna chromatograficzna firmy Sigma-Aldrich (1 cm x 20 cm)
2. Probówki szklane ze skalą - 20 szt.
3. Mikropipeta automatyczna 20-200 µl (2 szt./grupa) i 1000 µl (1 szt. /grupa) + końcówki do pipet automatycznych
4. Pipety pasterowskie
5. Zlewki (250 ml)
6. Kolba Erlenmayer'a (500 ml)
7. Markery
8. Bagietka szklana
9. Spektrofotometry
10. Papier milimetrowy
11. Strzykawki (6 szt./ grupa)
12. Cylindry (50 ml) (6 szt./ grupa)

IV. ODCZYNNIKI

1. Sephadex G-75 w 90 ml roztworu 0,85% NaCl (moczony przez 24 godz. i następnie odpowietrzony)
2. 0,85% NaCl
3. Próbka do rozdzielenia: 1,5 ml 0,85 % roztworu NaCl zawierającego: 5 mg Blue Dextranu, 10 mg cytochromu C, 9 mg dwuchromianu potasu, 2 % sacharozy (dla całej grupy);

[Masy: Blue Dextran-2000000 Da; cytochrom c- 13000 Da; dwuchromian potasu- 300 Da]

V. WYKONANIE ĆWICZENIA

Formowanie kolumny z żelu Sephadex G75

Kolumnę szklaną, owiniętą kilkoma kawałkami ligniny, ustawić pionowo w ,,łapie" metalowego statywu, zamknąć jej wylot zaciskaczem i wlać do niej 2 ml NaCl. Następnie ostrożnie wlać (po bagietce) do kolumny energicznie zamieszaną uprzednio zawiesinę żelu Sephadex.

Uwaga! Przed zamieszaniem, zawiesina w zlewce powinna być przygotowana tak, aby 2/3 jej objętości stanowił osiadły żel, a 1/3 roztwór NaCl.

Ostrożnie otworzyć zacisk kolumny. Roztwór soli powinien wypływać z szybkością 1 kropla/sek. Wysokość uformowanego żelu powinna wynosić 14-16 cm. Po uformowaniu warstwy o żądanej wysokości zamknąć wylot kolumny, pozostawiając nad powierzchnią żelu minimum 1 cm roztworu.

Uwaga! Kolumna uformowana z żelu Sephadex musi zawsze być przykryta warstwą roztworu, aby nie dopuścić do wyschnięcia górnej powierzchni złoża i jego zapowietrzenia!

Równoważenie kolumny

Uformowaną kolumnę równoważyć za pomocą 15-20 ml 0,85% roztworu NaCl. W tym celu, w cylindrze miarowym, w którym znajduje się roztwór NaCl umieścić wężyk podłączony do nakrętki kolumny. Za pomocą strzykawki zaciągnąć roztwór przez wężyk, a następnie połączyć z wlotem nakrętki kolumny. Ostrożnie otworzyć zacisk kolumny. Tak jak poprzednio roztwór soli powinien wypływać z szybkością 1 kropla/sek.

Frakcjonowanie na żelu Sephadex

Po przemyciu żelu zaznaczyć markerem górną granicę złoża, przerwać dopływ cieczy do kolumny, po czym zamknąć wylot kolumny, pozostawiając nad powierzchnią żelu warstwę minimum 1 cm roztworu. Przy pomocy mikropipety nanieść na żel 0,2 ml roztworu badanej próbki podwarstwiając ją ostrożnie pod roztwór NaCl (nie wolno naruszyć powierzchni żelu!). Podstawić pod kranik kolumny pierwszą probówkę ze skalą i ostrożnie podłączyć zbiornik z roztworem NaCl do kolumny. Otworzyć kranik i zbierać eluat. Pierwsze 3 ml wycieku zbierać do jednej probówki ze skalą (pierwsza probówka), następnie zbierać frakcje o obj. 1 ml również do probówek ze skalą aż do momentu całkowitego zaniku żółtego zabarwienia eluatu. Przerwać elucję, wypakować żel z kolumny z powrotem do zlewki! Zmierzyć objętość jaką zajmował żel, napełniając kolumnę wodą i mierząc cylindrem objętość wody, mieszczącej się w części kolumny zaznaczonej uprzednio kreską. Wartość tę (V_t) zanotować.

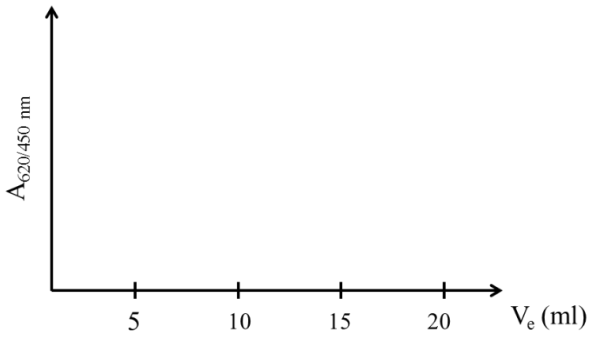
Wyniki i obliczenia

Zmierzyć absorbancję frakcji zawierających Blue Dextran przy długości fali 620 nm a frakcji, zawierających cytochrom c i dwuchromianu potasu przy 450 nm. Zanotować wyniki:

Tabela 1. Wyniki absorbancji zebranych frakcji eluatu.

Nr fakcji	V_e (ml)	Absorbancja	
		620 nm (Blue Dextran)	450 nm (cytochrom c. dwuchromian potasu)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Sporządzić na papierze milimetrowym diagram elucji w/g wzoru.



Obliczyć dla cytochromu c i dwuchromianu wartość K_{av} w/g wzoru:

$$K_{av} = (V_e - V_0)/ (V_t - V_0)$$

gdzie: V_e- objętość elucyjna badanej substancji

V_0- objętość elucyjna Blue Dextranu V_0 =

V_t- objętość całkowita złoża V_t =

Tabela 1

Substancja	V_e (ml)	$V_e - V_0$ (ml)	$(V_e - V_0)/ (V_t - V_0)$
Cytochrom c			
Dwuchromian potasu			

VI. WYNIKI I WNIOSKI - SPRAWOZDANIE:

1. Temat ćwiczenia
2. Cel
3. Opisać wynik rozdziału mieszaniny na złożu Sephadex G75, na jakiej zasadzie zachodził rozdział poszczególnych składowych mieszaniny?
4. W jakim celu mierzono absorbancję poszczególnych frakcji?
5. Przedstawić na jednym wykresie diagramy elucji (zależność absorbancji od objętości elucji) dla pomiarów uzyskanych przy długości fali równej 450nm oraz 620 nm.
6. Wyznaczyć wartości V_t, V_o, V_{e1} oraz V_{e2} i przedstawić uzupełnioną tabelę 1.
7. Przeanalizować wartości współczynników dostępności badanych związków. Czy ich wartości zgodne są z danymi literaturowymi? O czym informują uzyskane wartości K_{av} dla poszczególnych związków?

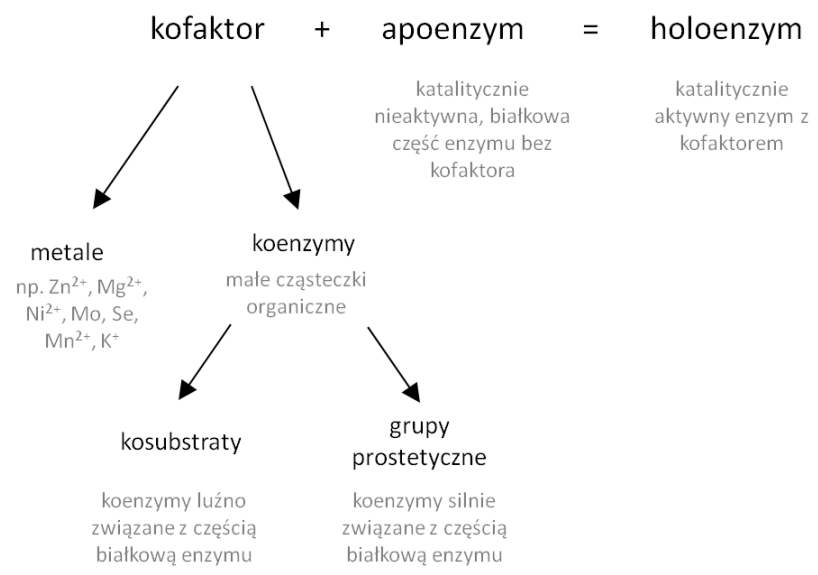
4. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI KWAŚNEJ FOSFATAZY W HOMOGENACIE Z KIEŁKÓW ROŚLINNYCH

I. ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- ✓ Enzymy jako katalizatory reakcji biochemicznych (wpływ enzymów na równowagę reakcji i energię aktywacji, miejsce aktywne enzymu, kompleksy enzym - substrat, specyficzność substratowa, podział enzymów ze względu na budowę oraz rodzaj katalizowanej reakcji).
- ✓ Klasyfikacja enzymów.
- ✓ Czynniki wpływające na aktywność enzymatyczną (temperatura, pH, kofaktory, stężenie substratu).
- ✓ Pojęcia: kofaktor, koenzym, grupa prostetyczna, holoenzym, apoenzym, izoenzymy, enzymy allosteryczne, jednostka enzymu (U), aktywność właściwa, aktywność molekularna (liczba obrotów).
- ✓ Kinetyka reakcji enzymatycznej - równanie Michaelisa Menten, wykres zależności szybkości reakcji od stężenia substratu.
- ✓ Dokładna znajomość części doświadczalnej oraz umiejętność sprawnego przeliczania stężeń.

II. WSTĘP

Enzymy to katalizatory, które zwiększają szybkość reakcji chemicznej, same nie ulegając zmianie. Mogą one mieć budowę monomeryczną, posiadając jeden łańcuch polipeptydowy lub oligomeryczną – są zbudowane z dwóch lub więcej podjednostek, będących odrębnymi łańcuchami białkowymi. W wielu przypadkach poza częścią białkową posiadają dodatkowo części nie będące białkami. Takie enzymy o złożonej budowie noszą nazwę holoenzymów. Ich część białkowa to apoenzym, natomiast część niebiałkowa to kofaktor, który może być jonem metalu lub małą cząsteczką organiczną (koenzymem) (rys. 1).



Rys. 1 Podział kofaktorów ze względu na ich budowę.

KLASYFIKACJA ENZYMÓW

W celu ujednolicenia klasyfikacji enzymów, powołana w 1964 roku Komisja Enzymowa (ang. *Enzyme Commission*) wprowadziła system nazewnictwa enzymów, który dzieli wszystkie enzymy na sześć głównych klas (1 – 6, tab. 1), opierając się na typie katalizowanych reakcji.

Tab. 1. Międzynarodowa klasyfikacja enzymów

Klasa	Nazwa	Typ katalizowanej reakcji		Przykład
1	Oksydo-reduktazy	Utlenianie-redukcja (przenoszenie elektronów)	$A^- + B \rightarrow A + B^-$	Dehydrogenaza mleczanowa Dehydrogenaza alkoholowa
2	Transferazy	Przenoszenie grup funkcyjnych	$A–B + C \rightarrow A + B–C$	Kinaza nukleozydomonofosfora-nowa (kinaza NMP) Heksokinaza
3	Hydrolazy	Reakcje hydrolizy (przenoszenie grup funkcyjnych na cząsteczki wody)	$A–B + H_2O \rightarrow A–H + B–OH$	Chymotrypsyna Trypsyna
4	Liazy	Utworzenie wiązań podwójnych poprzez dodanie lub usunięcie grup	A–B → A=B + X–Y | | X Y	Fumaraza Dehydrogenaza pirogronianowa
5	Izomerazy	Izomeryzacja (przenoszenie grup w obrębie cząsteczki)	A–B → A–B | | | | X Y Y X	Izomeraza triozofosforanowa Izomeraza maleinianowa
6	Ligazy (Syntetazy)	Ligacja (połączenie) dwóch substratów (tworzenie wiązań) sprzężone z hydrolizą ATP	A + B → A–B	Syntetaza aminoacylo-tRNA Karboksylaza pirogronianowa

Izoenzymy (izozymy) to różne formy enzymu, które katalizują tę samą reakcję, ale wykazują odmienne właściwości fizyczne lub kinetyczne (np. punkt izoelektryczny, optimum pH, powinowactwo do substratu, wrażliwość na inhibitory).

Miejsce aktywne enzymu to obszar który wiąże substrat (i kofaktor jeśli taki występuje) i przemienia je w produkt. Miejsce to zawiera reszty aminokwasowe (tzw. grupy katalityczne enzymu), które biorą bezpośredni udział w tworzeniu i zrywaniu wiązań.

Miejsce aktywne stanowi względnie niewielką część całej cząsteczki enzymu. Jest to określona trójwymiarowa przestrzeń, zagłębienie lub szczelina, zbudowana z aminokwasów pochodzących z różnych części sekwencji aminokwasowej (leżących w pewnej odległości od siebie w łańcuchu polipeptydowym).

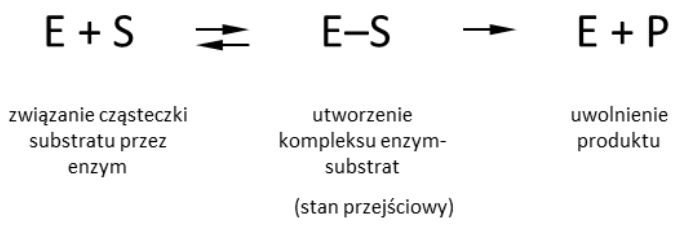
W centrum aktywnym można wyróżnić grupy aminokwasów pełniących różne role w katalizowanym procesie, są to:

- aminokwasy kontaktowe, których jeden lub więcej atomów jest oddalony od substratu na odległość odpowiadającą przeciętnej długości wiązania chemicznego; należą do nich aminokwasy wiążące substrat oraz biorące bezpośredni udział w katalizie;

- aminokwasy pomocnicze, które nie stykając się z substratem, pełnią jednak określoną rolę w czynności katalitycznej enzymu, właściwie orientując substrat.

Oprócz aminokwasów tworzących centrum aktywne, w cząsteczce enzymu występują aminokwasy stabilizujące jego strukturę przestrzenną oraz aminokwasy nie biorące udziału w stabilizacji budowy przestrzennej ani w funkcji katalitycznej. W obszarze centrum aktywnego wyróżnia się miejsce wiązania substratu, czyli miejsce określające specyficzność enzymu oraz miejsce katalityczne, czyli miejsce, w którym zachodzi katalizowana reakcja.

Szczelina miejsca aktywnego ma zazwyczaj charakter niepolarny co sprzyja wiązaniu substratu. Substrat/-y jest wiązany w miejscu aktywnym przez liczne słabe siły (np. oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, oddziaływania hydrofobowe) lub z niektórych przypadkach także przez odwracalne wiązania kowalencyjne. Po związaniu cząsteczki substratu i utworzeniu kompleksu enzym-substrat, katalitycznie czynne reszty znajdujące się w miejscu aktywnym enzymu działają na cząsteczkę substratu tak, aby początkowo przekształcić go w stan przejściowy, a następnie w produkt. Uwolnienie produktu zwalnia enzym, który może związać kolejną cząsteczkę substratu i rozpocząć nowy cykl katalityczny.



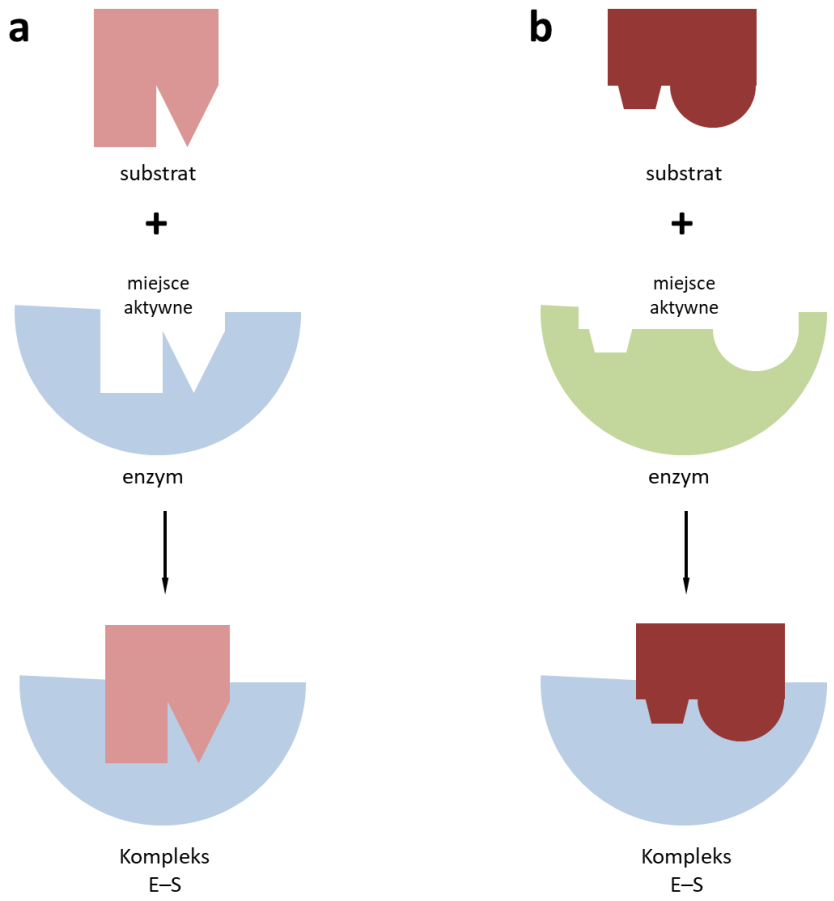
Rys. 2. Ogólny cykl katalityczny. E – enzym, S – substrat, P – produkt.

Specyficzność wiązania substratu zależy od precyzyjnie określonego ułożenia atomów w miejscu aktywnym. Ponieważ enzym i substrat oddziałują na siebie poprzez siły o niewielkim zasięgu, które wymagają bliskiego kontaktu, substrat musi mieć odpowiedni kształt, by mógł pasować do miejsca aktywnego. Zaproponowano dwa modele wyjaśniające jak enzym może wiązać swój substrat:

a) Model „zamka i klucza” (*model E. Fischera*) – przestrzenny kształt substratu i miejsca aktywnego pasują do siebie jak klucz do zamka. Są to struktury sztywne, trwałe, idealnie do siebie pasujące po odpowiednim zestawieniu (rys. 3a).

b) Model „indukowanego dopasowania” (*model Koshlanda*) – związanie substratu indukuje zmianę konformacyjną w miejscu aktywnym enzymu (rys. 3b).

Różne enzymy wykazują cechy charakterystyczne dla obu modeli, tzn. pewną komplementarność i pewne zmiany konformacji. Specyficzność substratowa może być „wąska” i dotyczyć tylko jednego rodzaju cząsteczki lub „szeroka” i dotyczyć grupy cząsteczek o podobnej budowie i charakterze.



Rys. 3. Model dopasowania substratu do enzymu a) jak „klucz do zamka”; b) indukowanego dopasowania

Enzymy są cząsteczkami labilnymi, dlatego mogą łatwo tracić swą katalityczną aktywność. Zniszczenie struktury fragmentów cząsteczki odpowiedzialnych za aktywność enzymu powoduje spadek lub całkowitą utratę jego aktywności, czyli inaktywację. Może to wystąpić m.in. wskutek zablokowania centrum aktywnego enzymu, degradacji cząsteczki lub zniszczenia struktury przestrzennej, czyli denaturacji. Denaturację enzymów powodują wszystkie czynniki chemiczne i fizyczne denaturujące białka.

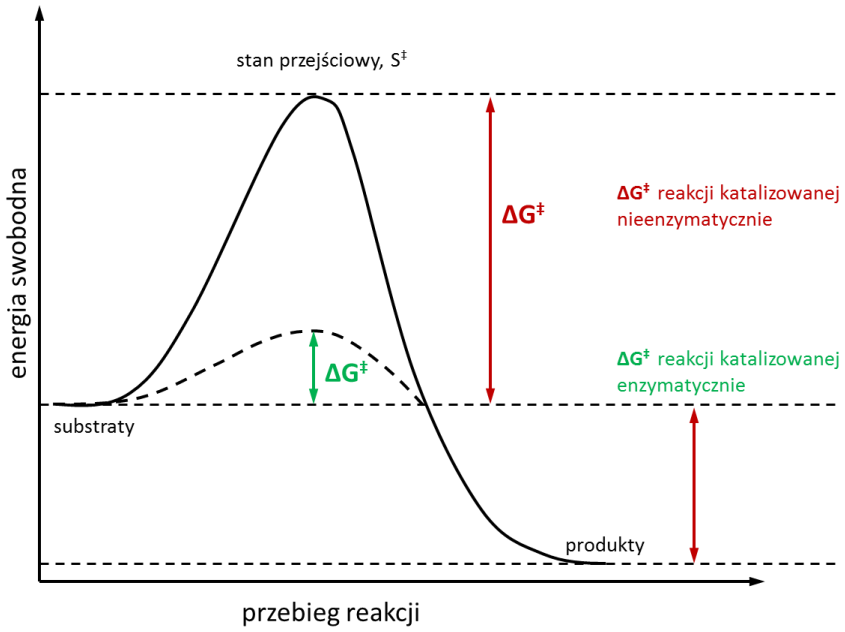
RÓWNOWAGA REAKCJI I ENERGIA AKTYWACJI

Aby zaszła reakcja biochemiczna musi zostać pokonana **bariera energetyczna** związana z przekształceniem cząsteczki substratu w **stan przejściowy**. Stan przejściowy ma w przebiegu reakcji największą energię swobodną (G). Różnica energii swobodnej miedzy substratem a stanem przejściowym nazywana jest energią aktywacji ($\Delta G^{\ddagger}$). Enzym stabilizuje stan przejściowy i zmniejsza wartość $\Delta G^{\ddagger}$, zwiększając przez to szybkość przebiegu reakcji (rys. 4).

Zmiana energii swobodnej G (ΔG) decyduje, czy reakcja będzie termodynamicznie korzystna, czy niekorzystna:

ΔG < 0 reakcja termodynamicznie korzystna, może zajść spontanicznie bez dopływu energii, reakcja egzoergiczna (rys. 4).

ΔG > 0 reakcja termodynamicznie niekorzystna i wymaga nakładu energii, nie zachodzi spontanicznie, reakcja endoergiczna.



Rys. 4. Zmiany energii zachodzące podczas przebiegu reakcji biochemicznej.

W układach biochemicznych nakład energii konieczny do przeprowadzenia reakcji termodynamicznie niekorzystnej uzyskuje się poprzez sprzężenie z reakcją termodynamicznie korzystną – tzw. **reakcje sprzężone**.

Reakcja chemiczna istnieje zazwyczaj w stanie równowagi dynamicznej, w której mimo ustawicznego przekształcania nowych cząstek substratu i tworzenia nowych cząstek produktu, proporcja substratu do produktu pozostaje stała. W równowadze stosunek stężeń substratu do produktu stanowi wartość stałą,

znaną jako **stała równowagi** (*K*). Stała równowagi jest określana przez stosunek szybkości reakcji w kierunku wprost (k_1) do szybkości reakcji w kierunku odwrotnym (k_{-1}). Enzymy nie zmieniają stałej równowagi reakcji ale zwiększają szybkość reakcji w obu kierunkach w tym samym stopniu, przyspieszając tym samym osiągnięcie stanu równowagi.

AKTYWNOŚĆ ENZYMU

Pomiar szybkości katalizowanej reakcji umożliwia określenie aktywności enzymu. Aby ułatwić porównywanie aktywności preparatów enzymatycznych, Komisja Enzymowa Międzynarodowej Unii Biochemicznej wprowadziła pojęcie międzynarodowej **standardowej jednostki „U”** (ang. U = *unit*). Jest to taka ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 µmola substratu w ciągu 1 minuty, w temp. 30°C i w optymalnych warunkach (optymalne pH i stężenie substratu zapewniające wysycenie enzymu). Mianem jednostki standardowej jest µmol/min. Aktywność enzymu najczęściej wyraża się jako początkowa szybkość katalizowanej reakcji (V_0).

Poza jednostką standardową (U) do wyrażania aktywności enzymu stosuje się również jednostkę o nazwie **katal** (kat). Jest to taka ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 mola substratu w ciągu 1 sekundy. Mianem katala jest mol/s. Jest to jednostka 60 milionów razy większa od jednostki standardowej, stąd też zaleca się stosowanie jednostek pokrewnych: mikrokatal (µkat =10^{-6} kat), nanokatal (nkat = 10^{-9} kat), pikokatal (pkat= 10^{-12} kat).

Zależność liczbowa pomiędzy jednostką standardową i katalem:

1 kat = 1 mol/s = 60 moli/min = 60 × 10^6 µmola/min = 6 × 10^7 U

1 U = 1 µmol/min = 1/60 µmola/s = 1/60 µkat = 16,67 × 10^{-9} kat = 16,67 nkat

Inną wielkością określającą zdolność enzymu do katalizowania reakcji chemicznych jest stała katalityczna k_{kat}, określająca stosunek szybkości maksymalnej reakcji V_{max} do całkowitego stężenia enzymu:

$k_{kat} = V_{max}/[E]$ = µM/s/µM = 1/s

Stała katalityczna (**liczba obrotów, aktywność molekularna**) określa liczbę cząsteczek substratu przetworzonych przez cząsteczkę enzymu w czasie 1 sekundy, w warunkach, w których enzym wykazuje maksymalną aktywność.

Inne wartości liczbowe charakteryzujące czysty enzym:

Aktywność całkowita – całkowita liczba jednostek enzymu w próbce

Aktywność specyficzna, **właściwa** – liczba jednostek standardowych enzymu na 1 mg białka (U/mg białka).

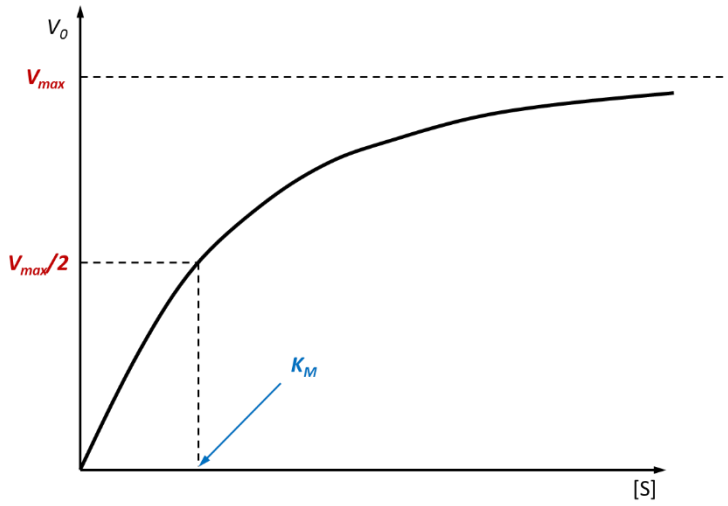
Szybkość reakcji enzymatycznej zależy od stężenia substratu i enzymu oraz warunków, w jakich jest przeprowadzana (temperatura, pH, obecność aktywatorów, lub inhibitorów).

MODEL MICHAELISA-MENTEN

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E{-}S \xrightarrow{k_2} E + P$$

Enzym E wiąże się z substratem S, tworząc kompleks enzym-substrat E–S, ze stałą szybkości k_1 . Kompleks E–S może z powrotem dysocjować do E i S ze stałą szybkości k_{-1} lub może się przekształcać tworząc produkt P, ze stałą szybkości k_2. Zakłada się, że produkt reakcji nie może ulec powrotnemu przekształceniu w wyjściowy substrat. Jest to warunek, który jest spełniany na początkowym etapie reakcji, zanim stężenie produktu stanie się znaczące.

Ponieważ stężenie E–S utrzymuje się na stałym poziomie dopóki w przybliżeniu całkowita ilość substratu nie zostanie zużyta, przez większość czasu przebiegu reakcji szybkość powstawania E–S jest równa szybkości jego przekształcania w P i wolny E, a więc E–S utrzymuje stan równowagi. Przy małych stężeniach substratu ([S]), kiedy [S] jest znacznie mniejsze do K_M, początkowa szybkość reakcji V_0 jest wprost proporcjonalna do [S], natomiast przy dużych stężeniach substratu, kiedy [S] jest dużo większe od K_M, szybkość zmierza do wartości maksymalnej V_{max}, czyli szybkość staje się niezależna od [S].



Rys. 5. Zależność między stężeniem substratu [S] a szybkością reakcji (V_0) – wykres hiperboliczny.

Równanie Michaelisa-Menten

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]} = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

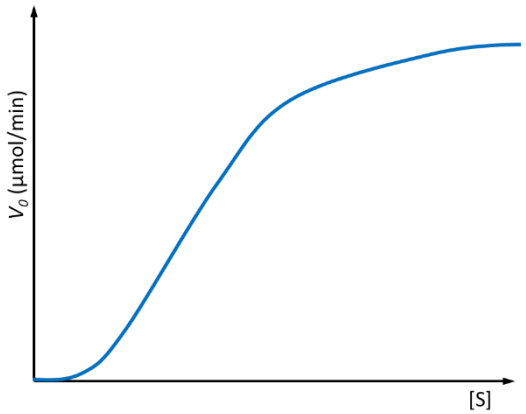
gdzie $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

jeśli [S] = K_M, wtedy $V_0 = \frac{V_{max}}{2}$

K_M (**stała Michaelisa**) jest równa takiemu stężeniu substratu [S] przy którym szybkość reakcji V_0 osiąga połowę swojej maksymalnej wartości. K_M jest miarą stabilności kompleksu E–S , stanowiąc iloraz sumy szybkości rozkładu E–S i szybkości jego powstawania. W przypadku, gdy $k_{-1} >> k_2$ (znacznie większe) to K_M staje się również miarą powinowactwa enzymu do substratu:

- wysoka wartość K_M wskazuje na słabe wiązanie substratu (gdyż $k_2 > k_1$)
- niska wartość K_M wskazuje na silne wiązanie substratu (gdyż $k_1 > k_2$)

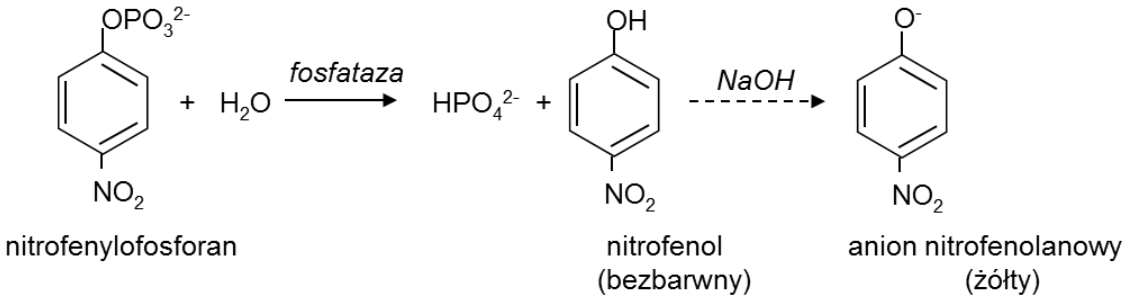
Grupą enzymów niedziałających zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten są enzymy allosteryczne. Enzymy te składają się z kilku podjednostek i kilku miejsc aktywnych. W przypadku tych enzymów wykres zależności szybkości reakcji V_0 od stężenia substratu [S] przybiera kształt sigmoidalny (Rys. 6).



Rys. 6. Wykres zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu enzymu allosterycznego.

Fosfatazy (fosfomonoesterazy) są enzymami katalizującymi hydrolityczny rozpad estrów kwasu fosforowego do odpowiedniego alkoholu i kwasu fosforowego. Enzymy te powszechnie występują zarówno w tkankach roślinnych jak i zwierzęcych. Wyróżniamy dwie klasy fosfataz: kwaśne, które wykazują maksymalną aktywność przy pH 4-6 oraz zasadowe z maksymalną aktywnością przy pH 8-9.

Kiełki roślinne są łatwo dostępnym źródłem szeregu enzymów w tym również kwaśnej fosfatazy o małej specyficzności w stosunku do substratu. Rola kwaśnej fosfatazy w roślinie polega na uwalnianiu rezerw fosforanu znajdujących się w kiełkujących ziarnach w postaci m. in. sześciofosforanu inozytolu. Enzym ten jest łatwo uwalniany w trakcie mieszania homogenizowanych kiełków w wodzie. Do oznaczania aktywności enzymu zostanie użyty syntetyczny substrat: nitrofenylofosforan sodu. Reakcja będzie przeprowadzana w warunkach optymalnych dla fosfatazy - w buforze cytrynianowym o pH 5,3. Produktem reakcji katalizowanej przez fosfatazę jest nitrofenol, bezbarwny w pH kwaśnym. Dodanie NaOH zatrzymuje reakcję i umożliwia przekształcenie nitrofenolu w barwny anion nitrofenolanowy.



Rys. 7. Przebieg reakcji z udziałem kwaśnej fosfatazy.

Ilość produktu reakcji można określić na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego. Oznaczanie aktywności fosfatazy prowadzi się przy stałym stężeniu substratu. Ilość enzymu należy dobrać tak, aby stężenie substratu nie ograniczało szybkości katalizowanej reakcji. Zawartość enzymu określa się w jednostkach aktywności, przyjmując za jednostkę taką ilość enzymu, która hydrolizuje 1 µmol nitrofenylofosforanu w ciągu minuty.

III. APARATURA I SPRZĘT LABORATORYJNY

1. Szklane probówki chemiczne
2. Pipety (1 ml, 5 ml) + nasadki
3. Statywy do probówek
4. Łaźnia wodna
5. Spektrofotometr
6. Kuwety do spektrofotometru
7. Moździerz
8. Kolba stożkowa (500 ml)
9. Papier milimetrowy
10. Lejek, sączek
11. Cylinder miarowy (200 ml)
12. Pipety automatyczne (250 µl, 500 µl)
13. Końcówki do pipet automatycznych
14. Waga

IV. ODCZYNNIKI

1. 0,005 M roztwór nitrofenylofosforanu sodu (przygotować bezpośrednio przed użyciem)
2. 0,1 M bufor cytrynianowy pH 5,3
3. 1 N NaOH
4. 0,5 mM roztwór p-nitrofenolu w wodzie
5. H_2O w lodówce do roztworów 1 i 4

V. WYKONANIE ĆWICZENIA

Przygotowanie ekstraktu enzymatycznego

3 g kiełków roślinnych rozgnieść w moździerzu z niewielką ilością wody, następnie przenieść je do cylindra miarowego i uzupełnić zimną wodą destylowaną do 100 ml. Zawiesinę dokładnie wymieszać i przesączyć przez bibułę filtracyjną do zlewki. Przesącz przechowywać w lodówce lub w lodzie. W przesączu znajduje się kwaśna fosfataza, której aktywność należy oznaczyć.

Oznaczanie aktywności enzymatycznej

A. Przygotowanie krzywej wzorcowej

W 7 probówkach przygotować mieszaniny zgodnie z Tabelą 1.

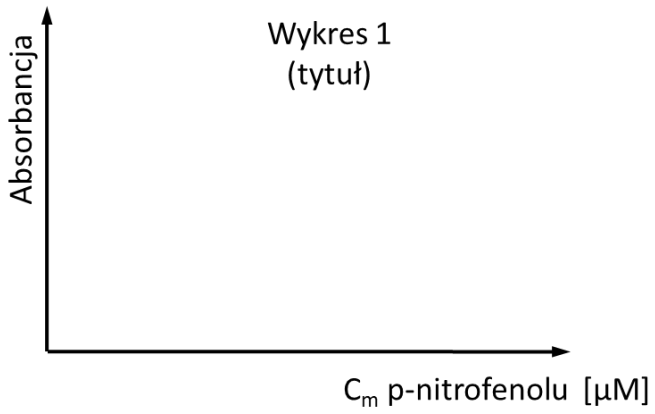
Tabela 1. Skład mieszanin reakcyjnych.

Nr probówki	0,5 mM p-nitrofenol (ml)	1 N NaOH (ml)	Woda destylowana (ml)
1	0	1	5
2	0,1	1	4,9
3	0,25	1	4,75
4	0,5	1	4,5
5	1	1	4
6	1,5	1	3,5
7	2	1	3

Próby wymieszać, przelać do kuwet spektrofotometrycznych i zmierzyć ich absorbancję przy długości fali 430 nm. Obliczyć stężenie p-nitrofenolu w każdej próbie i uzupełnić tabelę 2. Sporządzić krzywą wzorcową dla p-nitrofenolu (zależność absorbancji od stężenia p-nitrofenolu w roztworze), wyznaczyć jej wzór oraz nachylenie.

Tabela 2. Wyniki pomiaru absorbancji dla prób o wzrastającym stężeniu p-nitrofenolu

Nr probówki	C_m p-nitrofenolu (µM)	Absorbancja λ=430 nm
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		



Rys. 8. Wykres zależności absorbancji od stężenia p-nitrofenolu.

B. Przygotowanie mieszanin reakcyjnych

W 5 probówkach przygotować mieszaniny zgodnie z Tabelą 3.

Tabela 3. Skład mieszanin reakcyjnych.

Nr probówki	Homogenat z kiełków (ml)	Woda destylowana (ml)	Bufor cytrynianowy (ml)
1	0	2,0	1,0
2	0,5	1,5	1,0
3	1,0	1,0	1,0
4	1,5	0,5	1,0
5	2,0	0	1,0

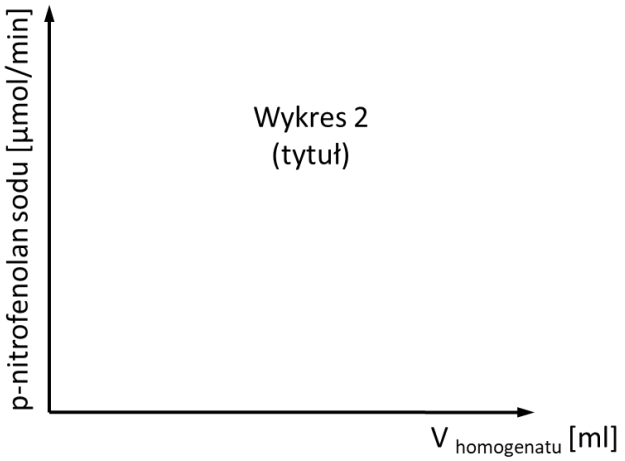
Próby po dokładnym wymieszaniu wstawić do łaźni wodnej o temp. 37 °C na 10 min (przygotowanie środowiska reakcji). Następnie do każdej probówki szybko dodać po 2 ml 0,005 M roztworu nitrofenylofosforanu sodu o temp. 37 °C i inkubować próby w temp. 37 °C przez kolejne 10 min (przebieg reakcji). Po tym czasie do każdej probówki dodać po 1 ml 1 M roztworu NaOH, wymieszać (zatrzymanie reakcji). Roztwory przelac do kuwet spektrofotometrycznych i przeprowadzić pomiar absorbancji przy długości fali 430 nm wobec próby kontrolnej (probówka nr 1). Wyniki wpisać do Tabeli 4.

Tabela 4. Dane opisujące zależność ilości zhydrolizowanego p-nitrofenylofosforanu (µmole/min) od objętości homogenatu.

Nr probówki	Homogenat z kiełków (ml)	Absorbancja przy λ=430 nm	C_m p-nitrofenolu (µM)	Całkowita ilość moli zhydrolizowanego p-nitrofenylofosforanu (µmol)	Ilość moli zhydrolizowanego p-nitrofenylofosforanu w czasie 1 minuty (µmol/min)
1	0				
2	0,5				
3	1,0				
4	1,5				
5	2,0				

Na podstawie wyników pomiaru absorbancji w próbach 1-5 (Tabela 4) odczytać z krzywej wzorcowej (podpunkt A) stężenie powstałego p- nitrofenolu w każdej próbie, a następnie obliczyć liczbę moli p-nitrofenolu, które utworzyły się w wyniku reakcji enzymatycznej w każdej próbie. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczyć całkowitą liczbę moli zhydrolizowanego p-nitrofenylofosforanu dla każdej próby i obliczyć ilość moli zhydrolizowanego p-nitrofenylofosforanu w czasie 1 minuty. Wyniki wpisać do Tabeli 4.

Przedstawić krzywą hydrolizy p-nitrofenylofosforanu sodu w obecności kwaśnej fosfatazy odkładając na osi rzędnych µmole zhydrolizowanego substratu/min, a na osi odciętych ilość dodanego homogenatu w ml (rys. 9).



Rys. 9. Wykres zależności ilości zhydrolizowanego p-nitrofenolu /min od objętości homogenatu

VI. WYNIKI I WNIOSKI - SPRAWOZDANIE:

1. Temat ćwiczenia
2. Cel
3. Przedstawić krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia p-nitrofenolu w próbie (wykres 1). Przedstawić dane niezbędne do wyznaczenia krzywej wzorcowej (Tabela 2) oraz przykładowe obliczenia wraz z przeliczeniem jednostek.
4. Przedstawić wykres zależności ilości zhydrolizowanego substratu w jednej minucie od objętości homogenatu (wykres 2). Przedstawić dane niezbędne do wyznaczenia krzywej (Tabela 4) oraz przykładowe obliczenia wraz z przeliczeniem jednostek.
5. Na podstawie uzyskanych wyników, wyznaczyć objętość homogenatu, w której zawiera się 1 jednostka enzymu kwaśnej fosfatazy oraz obliczyć ile jednostek enzymu znajduje się w 1 ml homogenatu.
6. Wyznaczyć ile jednostek enzymu znajduje się w 1 g kiełków.

5. HAMOWANIE KOMPETYCYJNE I NIEKOMPETYCYJNE AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY BURSZTYNIANOWEJ

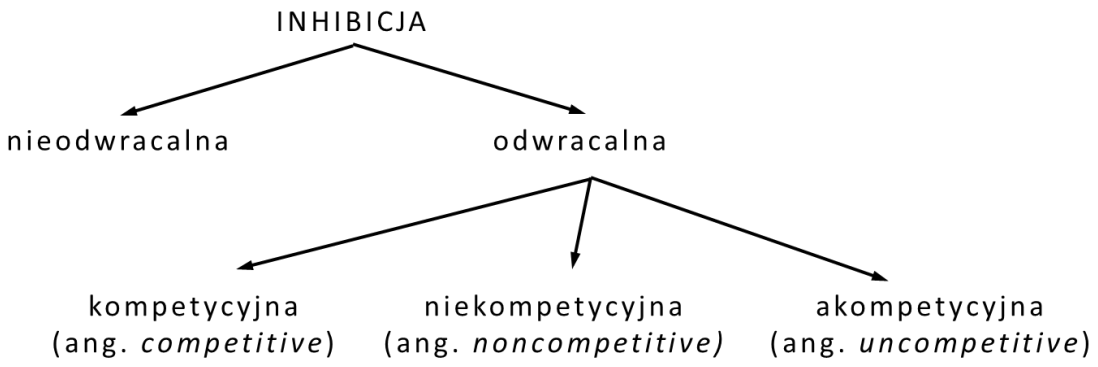
I. ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- ✓ Klasyfikacja enzymów.
- ✓ Budowa enzymu (apoenzym, holoenzym, koenzym, grupa prostetyczna, centrum aktywne).
- ✓ Cechy enzymu (swoistość działania, typy swoistości względem substratu - przykłady).
- ✓ Funkcja enzymów, ich znaczenie oraz charakter reakcji enzymatycznej.
- ✓ Kinetyka reakcji enzymatycznej (równanie i krzywa Michaelisa - Menten).
- ✓ Inhibicja enzymów: nieodwracalna i odwracalna (kompetycyjna, niekompetycyjna, akompetycyjna), hamowanie allosteryczne.
- ✓ Struktura i funkcja enzymów allosterycznych.
- ✓ Dehydrogenaza bursztynianowa - struktura, funkcja, lokalizacja.
- ✓ Dokładna znajomość części doświadczalnej oraz umiejętność sprawnego przeliczania stężeń.

II. WSTĘP

W kinetyce reakcji enzymatycznej podstawową funkcję odgrywają procesy inhibicji i aktywacji. Inhibitory to związki obniżające szybkość reakcji enzymatycznej. Mogą to być metabolity komórkowe, które hamują enzym w ramach naturalnej kontroli odpowiedniego szlaku metabolicznego, ale również substancje obce dla organizmu np. antybiotyki, narkotyki, trucizny i toksyny.

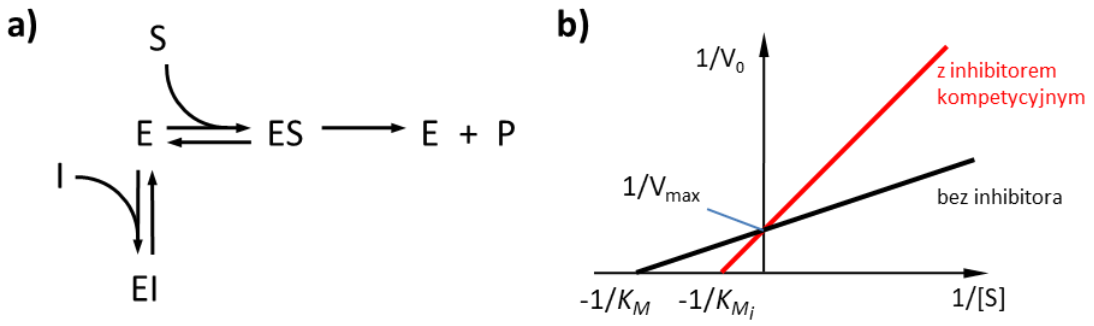
Rozróżnia się dwa typy inhibicji enzymów: inhibicję odwracalną i nieodwracalną, przy czym inhibicja odwracalna dzieli się na inhibicję kompetycyjną, niekompetycyjną i akompetycyjną (rys. 1).



Rys. 1 Typy inhibicji enzymatycznej.

Inhibicja nieodwracalna zachodzi, gdy inhibitor wiąże się z enzymem w miejscu aktywnym lub w jego pobliżu, tworząc trwałe wiązania (np. wiązania kowalencyjne) i blokując tym samym dostęp substratu do miejsca aktywnego. Wzrost stężenia substratu nie wpływa na odwrócenie inhibicji i zajście reakcji (utworzenie produktu).

W inhibicji kompetycyjnej inhibitor jest zazwyczaj strukturalnie podobny do właściwego substratu danego enzymu i współzawodniczy z nim o wiązanie się z centrum aktywnym. Enzym może wiązać albo cząsteczkę substratu, albo cząsteczkę inhibitora, ale nie obie równocześnie (Rys. 2a). Inhibitor kompetycyjny wypiera substrat z centrum aktywnego i wiąże się z miejscem aktywnym odwracalnie (nietrwale). Wzrost stężenia substratu powoduje wyparcie inhibitora z miejsca aktywnego, cofniecie efektu inhibicji i zajście reakcji (powstanie produktu). W tym rodzaju inhibicji substrat współzawodniczy z inhibitorem o miejsce aktywne, więc podczas reakcji nie następuje zmiana wartości V_{max} enzymu (reakcja, po związaniu substratu, zachodzi z taką samą prędkością, bez względu na to, czy wcześniej w miejscu aktywnym był związany inhibitor czy nie). Obecność inhibitora kompetycyjnego pozornie zmniejsza natomiast powinowactwo enzymu do jego substratu, co powoduje wzrost wartości K_M (rys. 2b).

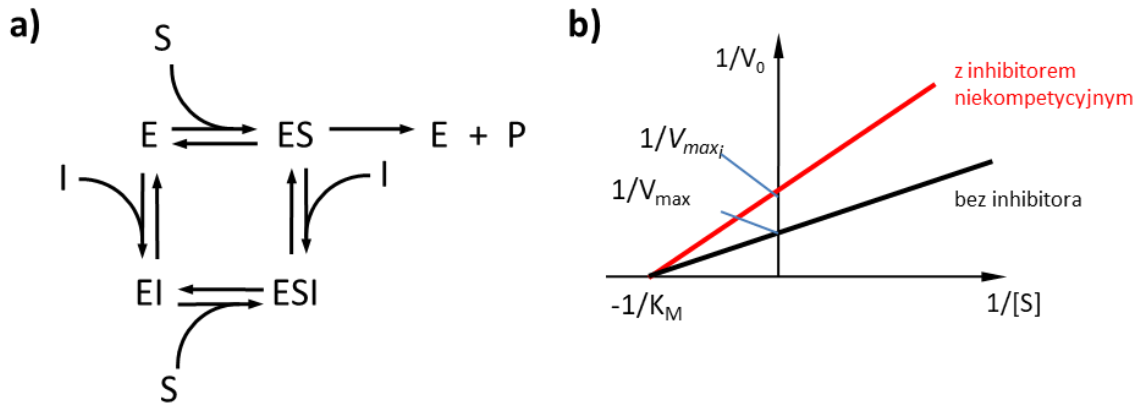


Rys. 2 Charakterystyka inhibicji kompetycyjnej; a) enzym może wiązać albo substrat, albo inhibitor kompetycyjny, ale nie oba razem; b) wykres Lineweavera-Burka kinetyki enzymu ukazujący wpływ inhibitora kompetycyjnego na wartość K_M i V_{max}.

Klasycznym przykładem inhibicji kompetycyjnej jest hamowanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej przez kwas malonowy (malonian). Dehydrogenaza bursztynianowa to integralne białko błony mitochondrialnej, enzym uczestniczący w cyklu Krebsa, który katalizuje utlenianie bursztynianu do fumaranu. Enzym nie odróżnia malonianu (inhibitor) od bursztynianu (substrat), ale kompleks enzym-malonian nie ulega rozpadowi i nie uzyskujemy produktów reakcji.

W inhibicji niekompetycyjnej inhibitor wiąże się odwracalnie w innym miejscu enzymu niż jego centrum aktywne, dlatego może wiązać się z enzymem w sposób niezależny od substratu. Inhibitor wiążąc się, powoduje zmianę kształtu centrum aktywnego enzymu, co prowadzi do zmniejszenia aktywności katalitycznej. Inhibitor może przyłączyć się do wolnego enzymu lub do kompleksu ES. Podobnie substrat może wiązać się z wolnym enzymem, a także z kompleksem EI (Rys. 3a). Powstający ostatecznie kompleks enzym–substrat–inhibitor (ESI) jest nieaktywny katalitycznie, ponieważ związanie inhibitora uniemożliwia uzyskanie przez centrum aktywne enzymu odpowiedniej konformacji. Wzrost stężenia substratu nie wpływa na

odwrócenie/zmniejszenie efektu inhibicji, dlatego wartość V_{max} maleje. Powinowactwo enzymu do substratu natomiast pozostaje niezmienione, zatem wartość K_M nie zmienia się (Rys. 3b), a ponieważ inhibitor niekompetycyjny wiąże się poza miejscem aktywnym, stanowi rodzaj inhibitora allosterycznego.



Rys. 3 Charakterystyka hamowania niekompetycyjnego. a) enzym może wiązać albo substrat, albo inhibitor niekompetycyjny, albo oba jednocześnie; b) wykres Lineweavera-Burka kinetyki enzymu ukazujący wpływ inhibitora niekompetycyjnego na wartość K_M i V_{max}.

Przykładem inhibicji niekompetycyjnej jest odwracalne wiązanie się niektórych jonów (np. Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{+}) z grupami –SH reszt cysteinowych dehydrogenazy bursztynianowej, zlokalizowanych poza centrum aktywnym enzymu. Grupy –SH, niezbędne dla aktywności enzymu, pomagają w utrzymaniu określonej konformacji cząsteczki. Ich blokowanie przez inhibitor niekompetycyjny prowadzi do niekorzystnych zmian konformacyjnych i blokowania reakcji. Nawet znaczne stężenie substratu nie jest w stanie cofnąć inhibicji.

Pomiar aktywności dehydrogenazy bursztynianowej

Aby zbadać wpływ wybranych inhibitorów na aktywność enzymu dehydrogenazy bursztynianowej, należy przeprowadzić szereg reakcji, z użyciem różnych stężeń substratu (przy działaniu danego inhibitora). Przy pomiarze aktywności dehydrogenazy bursztynianowej wykorzystuje się metodę, w której elektrony, będące jednym z produktów reakcji przenoszone są na sztuczny akceptor, którym w doświadczeniu jest żelazicyjanek potasu. Redukcji żelazicyjanku do żelazocyjanku towarzyszy zanik żółtej barwy roztworu. Zanik barwy jest równoznaczny z zajściem reakcji (utworzeniem produktów).

III. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

1. Łaźnia wodna o temp. 37°C
2. Homogenizator
3. Zlewka (200 ml)
4. Probówki (20 ml- 24 szt.)
5. 2 statywy na probówki
6. Lejki (6-12 szt.)
7. Bibuła filtracyjna
8. Pipety (5 ml) + nasadki na pipety i gumowe gruszki
9. Mikropipety automatyczne + końcówki do pipet automatycznych
10. Nożyczki
11. Pęseta
12. Cylinder miarowy (200 ml)
13. Nóż, deska do krojenia
14. Bagietka szklana

IV. ODCZYNNIKI

1. 0,1 M bufor fosforanowy pH 7,3
2. 0,1 M bursztynian sodu pH 7,0
3. 0,05 M malonian sodu pH 7,0
4. 0,01 M chlorek rtęciowy
5. 0,5 % żelazicyjanek potasu pH 7,0
6. 10 % kwas trójchlorooctowy (TCA)
7. 0,25 M sacharoza
8. Wątroba wieprzowa

V. WYKONANIE ĆWICZENIA

Przygotowanie probówek z roztworami inkubacyjnymi

Do 12 ponumerowanych probówek odmierzyć roztwory inkubacyjne według załączonego schematu (Tabela 1). Do próbówki nr 2 dodać 2 ml 10 % TCA. Probówki nr 1-4 służą jako próby kontrolne. Następnie wszystkie probówki wstawić do łaźni wodnej (37°C) na 10 min.

Tabela 1. Skład mieszanin reakcyjnych.

Nr probówki	0,1 M bufor fosforanowy (ml)	0,1 M bursztynian sodu (ml)	0,05 M malonian sodu (ml)	0,01 M chlorek rtęciowy (ml)	0,5 % żelazicyjanek potasu (ml)	Woda (ml)
1	1	0	0	0	0,5	3,0
2	1	0,1	0	0	0,5	2,9
3	1	0,1	0	0	0,5	2,9
4	1	0,1	0	0	0,5	2,9
5	1	0,1	0,1	0	0,5	2,8
6	1	0,5	0,1	0	0,5	2,4
7	1	1,0	0,1	0	0,5	1,9
8	1	1,5	0,1	0	0,5	1,4
9	1	2,0	0,1	0	0,5	0,9
10	1	0,1	0	0,1	0,5	2,8
11	1	1,0	0	0,1	0,5	1,9
12	1	2,0	0	0,1	0,5	0,9

Przygotowanie ekstraktu enzymatycznego

Rozdrobnioną porcję wątroby (dla całej grupy) umieścić w cylindrze miarowym i uzupełnić zimnym roztworem 0,25 M sacharozy do obj. 200 ml. Całość przenieść do homogenizatora i homogenizować przez 3 min. Uzyskany homogenat zawiera dehydrogenazę bursztynianową (należy go przechowywać w lodzie lub lodówce).

Reakcja inhibicji dehydrogenazy bursztynianowej

Do każdej probówki umieszczonej w łaźni wodnej (37°C) dodać po 1ml homogenatu (do tego celu używać pipety szklanej o jak najszerszym wylocie), wymieszać i inkubować przez 30 min. Następnie reakcję przerwać przez dodanie do każdej probówki 2 ml 10 % TCA (z wyjątkiem probówki nr 2) i przesączyć przez małe sączki do czystych probówek. Obserwować, w których próbówkach nastąpiło odbarwienie płynu i dane zebrać w Tabeli 2.

VI. WYNIKI I WNIOSKI - SPRAWOZDANIE:

1. Temat ćwiczenia
2. Cel
3. Obliczyć stężenie substratu oraz inhibitorów w poszczególnych próbówkach (przed dodaniem TCA) i wpisać do Karty wyników (przedstawić obliczenia dla każdej próby, uwzględniając przeliczenie jednostek).
4. Wpisać, która próba stanowiła kontrolę pozytywną, a która negatywną.
5. Przeanalizować stopień odbarwienia roztworu oraz typ inhibicji jaki zachodzi/powinien zajść w danej próbie.
6. Przeanalizować stężenie użytego substratu i inhibitora w każdej próbie i na tej podstawie wyjaśnić wpływ wzrostu stężenia substratu na inhibicję enzymu. Czy uzyskane wyniki są zgodne z założeniami teoretycznymi?
7. Wyznaczyć minimalny stosunek stężenia substratu do stężenia inhibitora, przy którym następuje całkowite cofnięcie inhibicji kompetycyjnej.

Karta wyników

Nr probówki	Stężenie molowe substratu [mM]	Stężenie molowe malonianiu [mM]	Stężenie molowe $HgCl_2$ [mM]	Odbarwienie roztworu żelazicyjanku (obserwacje)	Wnioski	Rodzaj próby/ typ inhibicji
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

6. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA I CHARAKTERYSTYKA CUKRÓW

I. ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA:

- ✓ Węglowodany: budowa i nazewnictwo, podział węglowodanów (mono-, oligo-, polisacharydy, przykłady, występowanie i funkcje).
- ✓ Pojęcia (wraz z przykładami): izomery konstytucyjne, stereoizomery, epimery, anomery, mutarotacja
- ✓ Właściwości chemiczne i fizyczne cukrów (m.in. właściwości redukujące mono- i disacharydów)
- ✓ Wykrywanie cukrów, reakcje barwne.
- ✓ Funkcje pełnione przez węglowodany w organizmie.
- ✓ Chromatografia cienkowarstwowa: zastosowanie, dobór sorbenta i rozpuszczalnika, chromatografia podziałowa, współczynnik przesunięcia (Rf).
- ✓ Dokładna znajomość części doświadczalnej oraz umiejętność sprawnego przeliczania stężeń.

II. WSTĘP

CHROMATOGRAFIA

Chromatografia jest techniką analityczną i preparatywną wykorzystującą rozdzielanie mieszanin substancji na poszczególne składniki, bądź ich grupy (frakcje), dzięki różnicom w zachowaniu się tych składników w układzie dwóch faz, w których jedna nie zmienia swego położenia (faza nieruchoma, stacjonarna), druga zaś porusza się względem pierwszej w określonym kierunku (faza ruchoma, roztwór rozwijający).

Ze względu na rodzaj dominującego mechanizmu procesu rozdziału chromatografie możemy podzielić na:

a) **adsorpcyjną** - gdy fazą ruchomą jest ciecz lub gaz, a nieruchomą ciało stałe o właściwościach adsorbujących i odpowiednim rozdrobnieniu (np. żel krzemionkowy, tlenek glinowy, węgiel aktywny itp.). Rozdział jest powodowany różnicami współczynników adsorpcji.

b) **podziałową** - gdy fazą ruchomą jest ciecz lub gaz, a stacjonarną ciecz zatrzymana na odpowiednim nośniku (bibuła, ziemia okrzemkowa, kulki szklane itp.). Rozdział jest wynikiem różnic współczynników podziału.

c) **jonowymienną** - gdy fazą ruchomą jest ciecz, a stacjonarną wymieniacz jonowy. Rozdział zależy od różnic w sile wiązania składników przez wymieniacz.

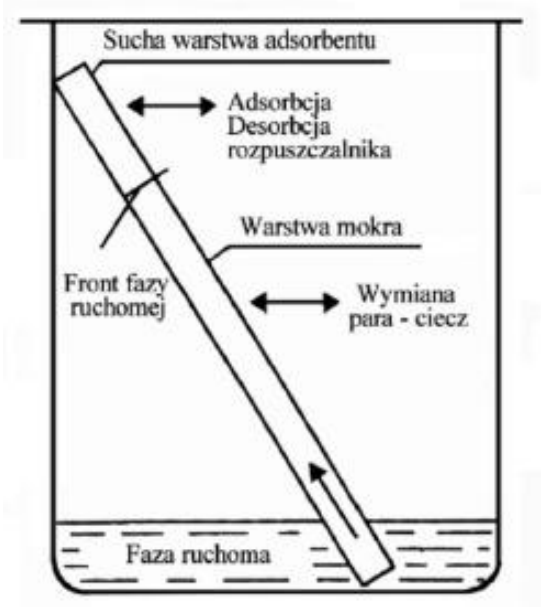
d) **żelową** - gdy fazą ruchomą jest ciecz, a nieruchomą granulowany, jednorodny spęczniały żel. Rozdział jest powodowany różnicami w zdolnościach dyfundowania do cząsteczek żelu, a więc różnicami w wielkości cząsteczek składników.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC – ang. *Thin Layer Chromatography*) jest metodą rozdzielania mieszanin substancji na podstawie w różnicy w powinowactwie poszczególnych substancji do dwóch faz: nieruchomej (cienka warstwa nośnika - adsorbentu) oraz ruchomej (eluentu).

- Nośnik (faza stała) formowany jest w postaci cienkich warstw na powierzchni szklanych lub aluminiowych płytek. Najczęściej używanymi nośnikami są żel krzemionkowy, tlenek glinu, ziemia okrzemkowa, celuloza i jej pochodne. Używa się je w postaci drobno sproszkowanej, czasami z domieszką substancji wiążącej, np. gipsu. Nośnik (faza stała) zawieszony w odpowiednim rozpuszczalniku daje się łatwo rozprowadzić na czystej powierzchni, dokładnie odtłuszczonej i suchej płytki, a po wysuszeniu twardnieje i przylega w postaci cienkiej warstwy do szkła. W niektórych przypadkach płytki wymagają aktywacji przez ogrzewanie w określonej temperaturze.
- Eluent (faza ruchoma) to zazwyczaj mieszanina rozpuszczalników organicznych w odpowiednich proporcjach, które powinny być neutralne w odniesieniu do rozdzielanych substancji, wykazywać znaczną lotność par, co znacznie ułatwia osiągnięcie równowagi ciecz-para, i niską gęstość, co przyspiesza usunięcie rozpuszczalnika z powierzchni płytki.

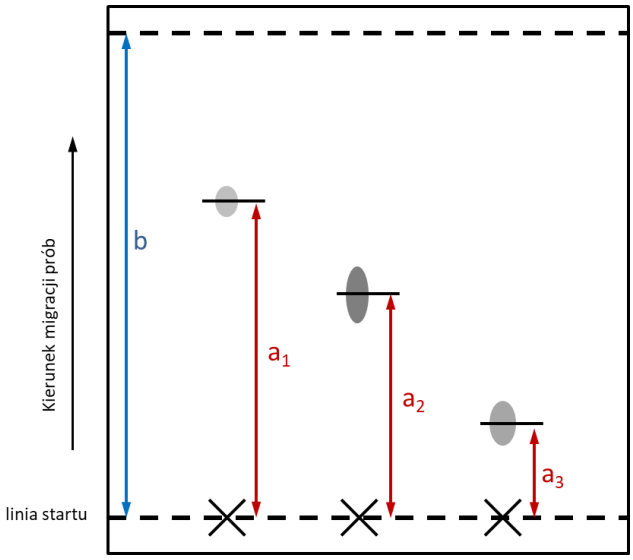
Najbardziej powszechnym sposobem rozwijania płytek chromatograficznych jest sposób liniowy:

- Mieszanina substancji, którą chcemy rozdzielić, nanoszona jest punktowo lub liniowo blisko dolnej krawędzi płytki TLC. Następnie płytka jest suszona, aby odparować rozpuszczalnik, w którym zawieszona jest mieszanina substancji rozdzielanych.
- Płytkę chromatograficzną ustawia się w pozycji pionowej bądź pod kątem w kilku mililitrach rozpuszczalnika w odpowiednim pojemniku zwanym komorą chromatograficzną (rys. 1). Ważne jest, aby poziom eluenta był poniżej miejsca, gdzie została nałożona próbka, aby nie rozpuścił jej bezpośrednio.



Rys.1. Schematyczny obraz procesów zachodzących w czasie rozwijania chromatogramu na płytce chromatograficznej

- Faza ruchoma powoli wspina się w górę płytki przez kapilarność, przeciągając za sobą substancje znajdujące się na płytce. Substancje w próbce będą migrować z różną prędkością, w zależności od ich powinowactwa do fazy nieruchomej (adsorbentu) oraz fazy ruchomej (rozpuszczalnika). Substancje bardziej polarne mają silniejsze oddziaływania z polarnym adsorbentem, przez co poruszają się wolniej, natomiast substancje mniej polarne szybciej migrują w górę płytki, bo są silniej oddziaływane przez eluent.
- Po zakończeniu procesu rozdzielania, płytka jest wyjmowana z komory i suszona. Jeśli substancje są bezbarwne, można je wizualizować za pomocą promieniowania UV, specjalnych odczynników lub poprzez reakcje barwne. W wyniku tego procesu na płytce pojawiają się plamki odpowiadające poszczególnym składnikom mieszaniny.
- Na podstawie uzyskanych wyników można obliczyć tzw. współczynnik Rf (ang. *Retention factor*) dla każdej substancji. Wartość Rf oblicza się jako stosunek odległości, jaką przebyła dana substancja, do odległości, jaką przebył rozpuszczalnik (rys. 2). Jest to pomocne przy identyfikacji substancji.



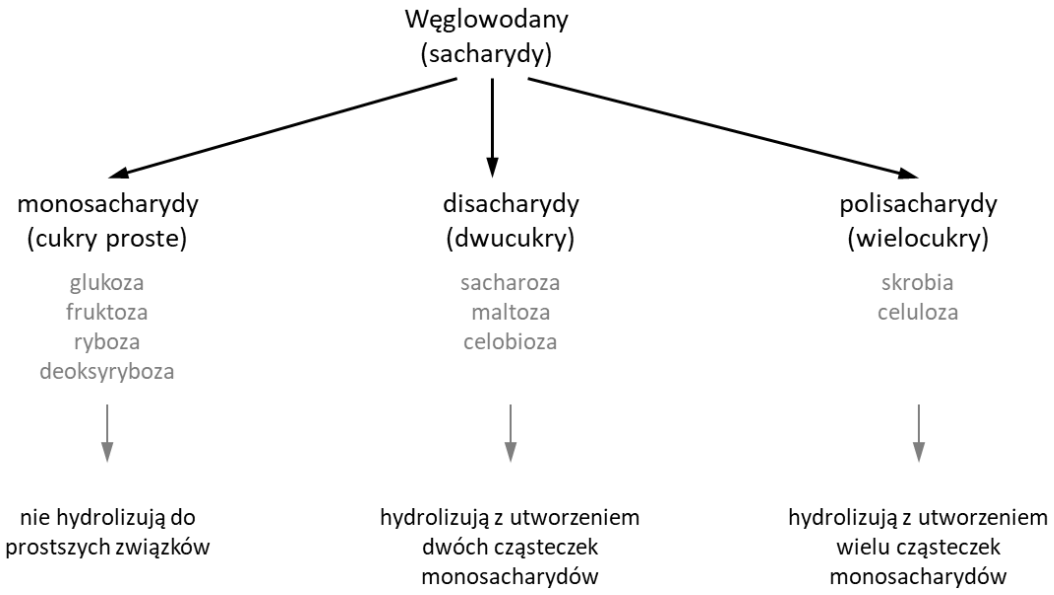
$$R_{f1} = \frac{a_1}{b}; \quad R_{f2} = \frac{a_2}{b}; \quad R_{f3} = \frac{a_3}{b}$$

Rys. 2. Sposób pomiaru i obliczania Rf; b – droga jaką przebył rozpuszczalnik; a_1, a_2, a_3 – droga jaką przebyła odpowiednio substancja 1, 2 i 3 (mierzona od linii startu do środka plamki); R_{f1}, R_{f2}, R_{f3} – współczynnik podziału odpowiednio dla substancji 1, 2 i 3.

TLC jest prostą, tanią i szybką metodą, która jest szeroko stosowana do rozdzielania, identyfikacji i analizy składu mieszanin chemicznych. Charakteryzuje ją przede wszystkim krótki czas rozwijania chromatogramów, wysoka czułość (możliwość analizowania stosunkowo małych ilości substancji), możliwość detekcji rozdzielonych substancji na dowolnym etapie rozwijania chromatogramu, w tym możliwość wywoływania chromatogramów stężonymi roztworami kwasów i zasad (z wyjątkiem płytek celulozowych), a także możliwość odzyskania substancji z chromatogramu (przez wyskrobanie nośnika z płytki i elucję substancji z nośnika). Chromatografia cienkowarstwowa może być w pełni zautomatyzowana i prowadzona w formie tzw. wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (ang. *High Performance Thin Layer Chromatography- HPTLC*) o wysokiej rozdzielczości.

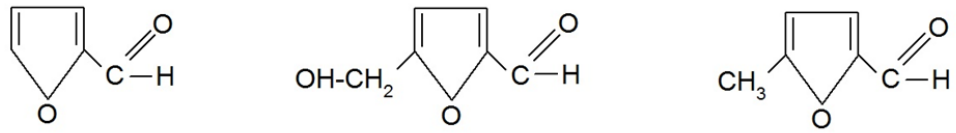
CUKRY

Cukry (węglowodany) to jedna z czterech, najważniejszych klas cząsteczek biologicznych. Są one zbudowane z węgla (C), wodoru (H) i tlenu (O), a ich głównym producentem są bogate w chlorofil rośliny. Cukry stanowią źródło energii organizmów żywych, biorą także udział w powstawaniu białek - ważnych materiałów budulcowych. Ponadto pełnią one rolę materiału zapasowego, strukturalnego oraz uczestniczą w przemianach metabolicznych.



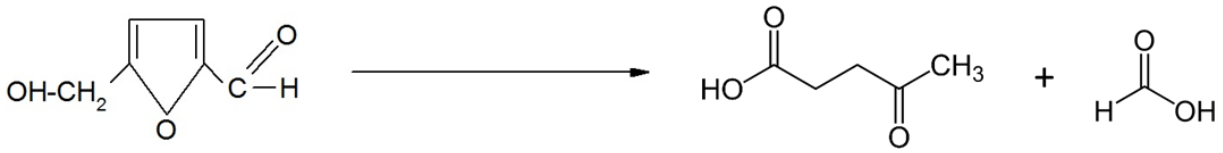
Rys. 1 Podział węglowodanów.

Cukry można oznaczać ilościowo a także wywoływać na chromatogramach przy pomocy charakterystycznych substancji barwnych. Wszystkie cukry, które zawierają więcej niż 4 atomy węgla w cząsteczce, ogrzewane z mocnymi kwasami (HCl lub H_2SO_4) ulegają odwodnieniu i cyklizacji dając pochodne furfuralowe.



furfural (z pentoz) | 5-hydroksymetylofurfural (z heksoz) | metylofurfural (z 6-deoksyheksoz)

Podczas dłuższego ogrzewania pochodne furfuralu ulegają dalszym przemianom np. w hydroksymetylofurfural, który ulega przekształceniu do kwasu lewulinowego i kwasu mrówkowego.



5-hydroksymetylofurfural | kwas lewulinowy | kwas mrówkowy

Pochodne furfuralu po kondensacji ze związkami zawierającymi grupy fenolowe lub fenyloaminowe dają produkty barwne. W metodzie oznaczania cukrów wg Dubois stosuje się fenol a produkty kondensacji mają barwę różową. W próbie antronowej przeprowadza się kondensację z antronem uzyskując produkty zabarwione na kolor niebieski. Natężenie barwy jest proporcjonalne do zawartości cukrów w próbie (przy ścisłym przestrzeganiu warunków reakcji).

Reakcje charakterystyczne cukrów

1. Odróżnianie cukrowców od innych związków organicznych – reakcja Molischa

Dodatnią próbę Molischa wykazują wszystkie cukry proste, oligosacharydy i polisacharydy. Oligosacharydy i polisacharydy ulegają najpierw hydrolizie do monosacharydów. Następnie cukry proste w obecności stężonego kwasu siarkowego ulegają odwodnieniu i przechodzą w furfural lub 5-hydroksymetylofurfural, które kondensują z α-naftolem dając fioletowy produkt kondensacji. Ujemny wynik próby Molischa wyklucza obecność cukru. Dodatni wynik próby Molischa dają również aldehydy, aceton i kwasy organiczne.

2. Właściwości redukujące cukrów

Do cukrów redukujących zalicza się wszystkie cukry proste oraz oligosacharydy, które posiadają wolną grupę aldehydową lub ketonową. Właściwości redukujące cukrów ujawniają się w środowisku zasadowym, ponieważ w wysokim pH formy pierścieniowe cukrów (brak wolnej grupy karbonylowej) przechodzą w formy łańcuchowe z uwolnioną grupą aldehydową lub ketonową. Cukry, redukując inne substancje np. jony metali ciężkich lub barwniki ulegają utlenieniu do odpowiednich kwasów organicznych. Najczęściej wykorzystuje się reakcje redukcji jonów miedzi Cu(II) do Cu(I).

3. Próba Benedicta

Odczynnik Benedicta to zasadowy roztwór o ciemnoniebieskim zabarwieniu, zawierający związek kompleksowy miedzi (II) z anionami kwasu cytrynowego. Pod wpływem cukrów redukujących (lub aldehydów) roztwór odbarwia się i wytrąca się osad tlenku miedzi(I) Cu2O. Barwa powstającego osadu tlenku miedziawego (I) zależy od stężenia cząsteczek wypadających z roztworu. Przy niskich stężeniach cukrów (0,1 – 0,5 %) uzyskujemy barwę zieloną, przy wyższych stężeniach barwę żółtą, następnie pomarańczową, a przy wysokich stężeniach (≥2 %) barwę czerwoną. Próba ta może służyć do przybliżonego określania stężenia cukru w badanym roztworze.

4. Reakcja Barfoeda

Reakcja Barfoeda z octanem miedzi(II) pozwala odróżnić cukry proste od disacharydów redukujących na podstawie różnic w szybkości redukcji jonów miedzi (Cu2+ do Cu+). Reakcja ta zachodzi w środowisku lekko kwaśnym, w którym reaktywność sacharydów jest znacznie obniżona. W wyniku reakcji cukry utleniają się do kwasu karboksylowego, powstaje też kwas octowy i wytrąca się ceglastoczerwony osad tlenku miedzi(I). Disacharydy redukujące ze względu na niższą reaktywność wolnych grup karbonylowych dają pozytywny wynik tej reakcji dopiero po dłuższym ogrzewaniu, gdy zostanie rozerwane wiązanie glikozydowe.

5. Wykrywanie polisacharydów

Wielocukry o odpowiednio dużych rozmiarach i uporządkowanej strukturze tworzą kompleksy z jodem. Do takich wielocukrów należą skrobia oraz glikogen. Skrobia składa się z 2 składników: amylozy i amylopektyny. Amyloza charakteryzuje się nierozgałęzionymi łańcuchami, tworzącymi układy spiralne, przy czym na 1 skręt przypada 6 reszt cukrowych (α-D-glukozy). Natomiast amylopektyna posiada budowę rozgałęzioną, przez co odcinki helikalne są krótsze. Zabarwienie skrobi pod wpływem jodu nie jest spowodowane reakcją chemiczną ale uwięzieniem jodu w kanale helisy. Barwa zależy od długości helisy: amyloza daje intensywne zabarwienie niebieskie, amylopektyna fioletowo-czerwone. Glikogen daje zabarwienie ciemnoczerwone.

III. APARATURA I SPRZĘT LABORATORYJNY

1. Płytki szklane 20 x 10 cm - 2 szt.
2. Cylinder miarowy 10 ml i 50 ml - 1 szt. i 1 szt.
3. Bagietka - 1 szt.
4. Kolba stożkowa 50 ml - 1 szt.
5. Mikropipeta automatyczna - 1 szt.
6. Pipety 1 ml i 5 ml - 2 szt. i 2 szt.
7. Nasadka do pipet - 1 szt.
8. Probówki - 11 szt.
9. Suszarka 60 °C
10. Suszarka 130 °C
11. Suszarka ręczna
12. Komora chromatograficzna - 1 szt.
13. Spryskiwacz - 1 szt.
14. Dozowniki - 2 szt.
15. Łaźnia wodna
16. Statyw na probówki
17. Końcówki do pipety automatycznej

IV. ODCZYNNIKI

1. Żel krzemionkowy
2. 0,02 M roztwór octanu sodu
3. 1 % roztwory cukrów: (1) ksylozy, (2) fruktozy, (3) glukozy, (4) sacharozy, (5) laktozy, (6) maltozy, (7) skrobi
4. 1 % mieszanina cukrów: 1 + 2+ 3 + 4 + 5
5. Mieszanina rozpuszczalników
6. chloroform: kwas octowy: woda (30: 35: 5)
7. Wywoływacz: 1 g dwufenyloaminy + 1 ml aniliny + 100 ml acetonu,

8. dodać 10 ml 85 % H_3P0_4 bezpośrednio przed użyciem!
9. 20 % etanolowy roztwór α-naftolu
10. Stężony H_2S0_4
11. Odczynnik Benedicta
12. Odczynnik Barfoeda
13. Roztwór jodu w jodku potasowym (płyn Lugola)
14. Sok owocowy – próba X

Uwaga! Podczas wykonywania części praktycznej ćwiczenia dotyczącej chromatografii cienkowarstwowej oraz przy pracy ze stężonym kwasem należy zachować szczególną ostrożność. Wszystkie czynności należy wykonywać pod wyciągiem.

V. WYKONANIE ĆWICZENIA

Chromatografia cienkowarstwowa

Przygotowanie płytek

Jedną płytkę szklaną (10 x 20 cm) dokładnie oczyszczoną i suchą odtłuścić watą lub ligniną nasączoną etanolem.

Do kolbki z 3 g żelu krzemionkowego dodać 10 ml 0,02 M octanu sodu. Mieszać delikatnie ruchem obrotowym około 1 min. Zawiesinę natychmiast wylać na odtłuszczoną płytkę szklaną. Posługując się bagietką rozprowadzić złoże równomiernie na powierzchni płytki (wyrównać poprzez przechylenie płytki na boki). Pozostawić w temp. pokojowej dla następnej grupy ćwiczeniowej.

Płytkę z żelem krzemionkowym obrysować w następujący sposób: 3 brzegi w odległości 5 mm od krawędzi. Nieobrysowany brzeg wąski posłuży jako linia startu dla rozdzielanych cukrów, które należy nanieść w odległości około 1,5 cm od dolnego brzegu płytki. Należy zachować odległości 1,5 cm pomiędzy nanoszonymi próbami.

Uwaga! Płytkę z żelem krzemionkowym należy bezpośrednio przed użyciem zaktywować przez ogrzanie 15 min w 60°C!

Nanoszenie prób

Nanieś na płytki z żelu krzemionkowego po 2 µl 1 % roztworów cukrów. Kolejność nanoszenia: (1) ksyloza, (2) fruktoza, (3) glukoza, (4) sacharoza, (5) laktoza, (6) mieszanina cukrów 1 + 2 + 3 + 4 + 5, (7) zawiązek X (do identyfikacji).

Rozwijanie chromatogramów

Płytkę z żelem krzemionkowym rozwijać w mieszaninie rozpuszczalników: chloroform: kwas octowy: woda (30: 35: 5). Chromatogram na żelu krzemionkowym należy wyjąć z komory, gdy front rozpuszczalników osiągnie górną granicę płytki. Chromatogramy wysuszyć w temperaturze pokojowej.

Wywołanie chromatogramów

Płytkę z żelem krzemionkowym delikatnie spryskać wywoływaczem zawierającym: 1 g dwufenyloaminy, 1 ml aniliny, 100 ml acetonu. Bezpośrednio przed użyciem dodać 10 ml 85 % H_3P0_4. Spryskaną płytkę ogrzewać przez 15 min w temp. 130 °C.

Obliczyć R_f dla naniesionych cukrów (ksylozy, fruktozy, glukozy, sacharozy i laktozy).

Reakcje charakterystyczne cukrów

1. Odróżnianie cukrów od innych związków organicznych - reakcja Molischa

Do ponumerowanych probówek odmierzyć kolejno po 0,5 ml 1 % roztworów: glukozy, sacharozy, skrobi, wody destylowanej i próby X. Do każdej próby dodać od 1 do 2 kropli świeżo przygotowanego 20 % etanolowego roztworu α- naftolu. Po dokładnym zmieszaniu bardzo ostrożnie, po ściance próbówki, wprowadzić 0,5 cm^3 stężonego roztworu H_2SO_4 tak, aby była widoczna granica miedzy cieczami.

2. Odróżnianie cukrów redukujących od nieredukujących - reakcja Benedicta

Do ponumerowanych probówek odmierzyć kolejno po 1 ml 1 % roztworów: glukozy, maltozy, sacharozy, skrobi, wody destylowanej i próby X. Do każdej próby dodać 2,5 ml odczynnika Benedicta i ogrzewać przez 5 min we wrzącej łaźni wodnej.

3. Odróżnianie cukrów prostych od dwucukrów redukujących

Do probówek odmierzyć kolejno po 1 ml 1 % roztworów: glukozy, maltozy i próby X. Do wszystkich prób dodać po 2,5 ml odczynnika Barfoeda i ogrzewać przez 3 min we wrzącej łaźni wodnej.

4. Wykrywanie wielocukrów

Do probówek odmierzyć kolejno po 1 ml 1 % roztworów: skrobi, glukozy, wody destylowanej i próby X. Do wszystkich prób dodać po 1 ml roztworu jodu w jodku potasowym.

VI. WYNIKI I WNIOSKI - SPRAWOZDANIE:

1. Temat ćwiczenia
2. Cel
3. Opisać reakcje charakterystyczne cukrów (obserwacje) i sformułować wnioski. Czy wynik reakcji jest zgodny z założeniami teoretycznymi?
4. Chromatografia cienkowarstwowa cukrów
   a. Opisać chromatogram (zaznaczyć linię startu, czoło rozpuszczalnika, opisać poszczególne ścieżki).
   b. Wyznaczyć Rf dla poszczególnych prób. Z czego wynikają różne wartości Rf dla badanych cukrów? Czy uzyskane wartości Rf są zgodne z danymi literaturowymi?
   c. Obserwacje: opisać rozdział prób za pomocą TLC (kształt plamek, duże/małe różnice w Rf).
   d. Dyskusja: czy metoda ta nadaje się do rozdziału oraz do identyfikacji wykorzystywanych w ćwiczeniu cukrów?
5. Na podstawie wyników reakcji charakterystycznych oraz rozdziału chromatograficznego wyznaczyć skład próby X.

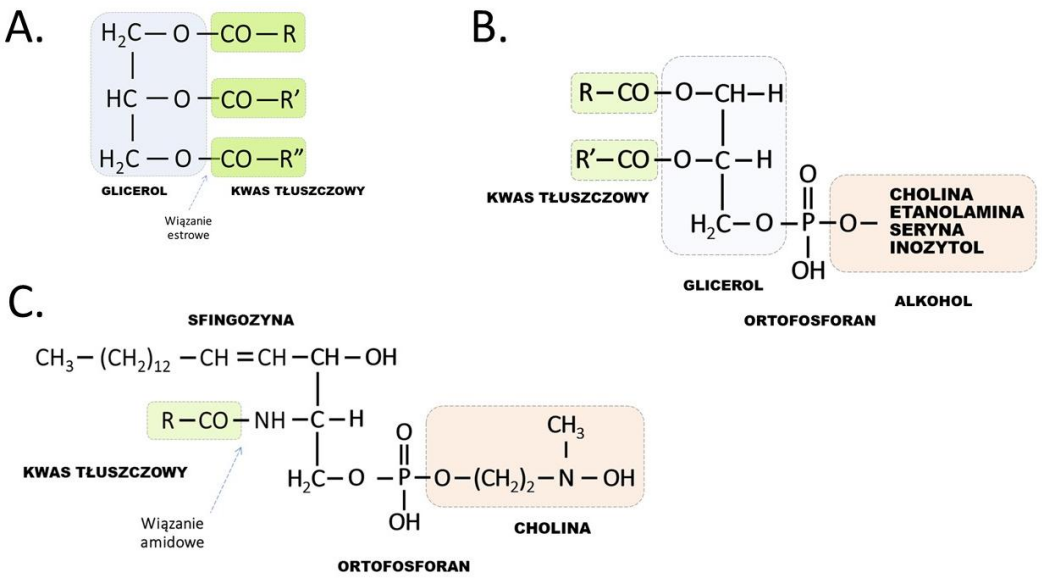
7. CHROMATOGRAFIA BIBUŁOWA I CHARAKTERYSTYKA LIPIDÓW

I. ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- ✓ Struktura, właściwości oraz funkcje kwasów tłuszczowych i lipidów.
- ✓ Chromatografia cienkowarstwowa i bibułowa
- ✓ Budowa błon biologicznych, model płynnej mozaiki, ruch cząsteczek w obrębie oraz przez błony biologiczne, micela, liposom, dwuwarstwa lipidowa, cząsteczki o właściwościach amfifilowych.
- ✓ Dokładna znajomość części doświadczalnej oraz umiejętność sprawnego przeliczania stężeń.

II. WSTĘP

Lipidy to liczna grupa związków organicznych o różnorodnym składzie i budowie, charakteryzujących się bardzo słabą rozpuszczalnością w wodzie i dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach niepolarnych, organicznych (np. chloroformie). Właściwości te wynikają z obecności w ich strukturze długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. W zwierzęcych kwasach tłuszczowych łańcuch węglowodorowy jest prawie zawsze nierozgałęziony. Wiązania podwójne w większości kwasów nienasyconych mają konfigurację cis, co powoduje zgięcie łańcucha w miejscu wiązania. Długość łańcucha węglowodorowego i liczba wiązań podwójnych wpływają na właściwości fizykochemiczne tłuszczów. Im krótsze łańcuchy, tym niższa temperatura topnienia tłuszczu. Im więcej kwasów nienasyconych w stosunku do kwasów nasyconych, tym niższa temperatura topnienia i większa płynność kwasów tłuszczowych i ich pochodnych. Wynika to z tego, że „zgięte", nienasycone łańcuchy nie wypełniają szczelnie przestrzeni – tak jak łańcuchy „wyprostowane" nasyconych kwasów – co pociąga za sobą zmniejszenie oddziaływań międzycząsteczkowych. Kwasy nienasycone zdolne są przyłączać w miejscach podwójnego wiązania wodór (tzw. utwardzanie tłuszczów) oraz chlorowce (ta reakcja wykorzystywana jest do ilościowego oznaczania zawartości kwasów nienasyconych w tłuszczu, oznaczenie tzw. liczby jodowej).

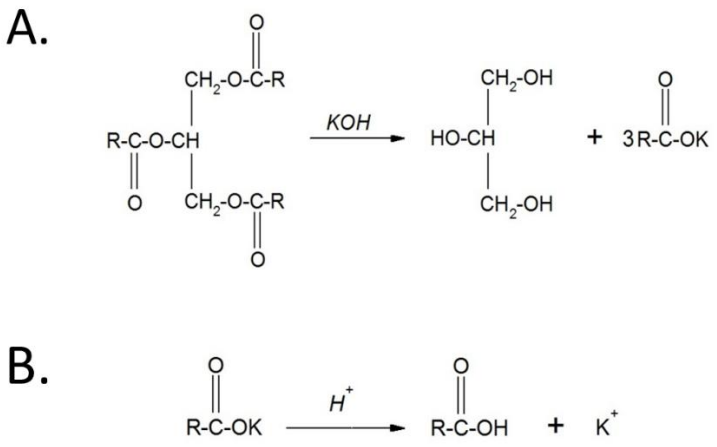


Rys. 1. Ogólny schemat budowy trójacyloglicerolu (A), fosfolipidów - glicerofosfolipidu (B) oraz sfingomieliny – najprostszego sfingofosfolipidu (C). R, R', R" – łańcuch węglowodorowy kwasu tłuszczowego.

Najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie lipidy to tłuszcze właściwe (trójacyloglicerole, trójglicerydy), fosfolipidy oraz sterole i ich estrowe pochodne.

Tłuszcze właściwe to estry glicerolu i kwasów tłuszczowych (Rys. 1A), stanowiące głównie materiały zapasowe (surowce energetyczne) organizmu, a także podściółkę i warstwę ochronną różnych narządów. Fosfolipidy posiadają w swojej strukturze alkohol stanowiący rdzeń cząsteczki (glicerol w glicerofosfolipidach lub sfingozyna w sfingofosfolipidach), do którego przyłączone są reszta kwasu ortofosforowego (wiązaniem estrowym) oraz reszty kwasów tłuszczowych (wiązaniem estrowym lub amidowym). Dodatkowo reszta ortofosforanowa połączona jest wiązaniem estrowym z alkoholem, np. choliną, etanolaminą, seryną, inozytolem (Rys. 1B). Fosfolipidy mają właściwości amfifilowe. Kwasy tłuszczowe tworzą hydrofobowe rejony fosfolipidów, natomiast hydrofilowe rejony fosfolipidów przyjmują ładunek wypadkowy, na który składają się ujemny ładunek reszty ortofosforanowej oraz ładunek pochodzący od przyłączonego poprzez ortofosforan alkoholu. Cholina i etanolamina posiadają po jednej grupie aminowej, co nadaje głowie fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanolaminy charakter dwupolarnego jonu bez ładunku wypadkowego. Seryna posiada grupę aminową i karboksylową, a inozytol nie jest obdarzony ładunkiem, stąd fosfatydyloseryna i fosfatydyloinozytol mają wypadkowy ładunek ujemny. Fosfolipidy ze względu na swoją budowę cząsteczkową są najbardziej polarnymi lipidami. Sterole posiadają szkielet węglowy w postaci czterech sprzężonych pierścieni z przyłączoną grupą hydroksylową. Najważniejszym przedstawicielem steroli w tkankach zwierzęcych jest cholesterol, będący prekursorem hormonów sterydowych, kwasów żółciowych i witaminy D. Jako składnik błon biologicznych wpływa na ich właściwości. Sztywna struktura pierścieni cholesterolu ogranicza ruchy sąsiadujących z nim lipidów błonowych, co powoduje zmniejszenie płynności błony i ograniczenie przepuszczalności. W temperaturach poniżej temperatury przejścia fazowego pierścienie cholesterolu utrudniają osiągnięcie stanu żelu, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie płynności błony w szerokim spektrum temperatur.

Obecność wiązania estrowego jest charakterystyczną cechą tłuszczów właściwych. Hydroliza wiązania estrowego pod wpływem przegrzanej pary wodnej prowadzi do powstania glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych. Dodatkowo reakcja hydrolizy może zachodzić pod wpływem kwasów, zasad lub enzymatycznie z udziałem lipaz. Rozszczepienie wiązania estrowego pod wpływem hydrolizy zasadowej daje glicerol i sole kwasów tłuszczowych, zwane mydłami. Proces ten nazywamy zmydlaniem (rys. 2). Ze względu na jego ilościowy przebieg może być wykorzystywany do analizy ilościowej kwasów tłuszczowych (oznaczenie tzw. liczby zmydlenia). Mydła można także otrzymać z wolnych kwasów tłuszczowych. Mydła sodowe i potasowe są rozpuszczalne, tworząc micelarne roztwory koloidowe. Natomiast mydła wapniowe, barowe i magnezowe, są nierozpuszczalne i wytrącają się w postaci osadu.



Rys. 2. Reakcja zmydlania tłuszczów; hydroliza zasadowa (A), otrzymywanie wolnych kwasów tłuszczowych (B).

Charakter amfifilowy cząsteczek soli kwasów tłuszczowych powoduje, że ich rejony hydrofilowe i hydrofobowe ustawiają się w charakterystyczny sposób w zależności od środowiska. W środowisku wodnym tworzą micele z rejonami hydrofobowymi skierowanymi do wewnątrz micelarnej struktury, natomiast w rozpuszczalnikach organicznych tworzą micele odwrócone z rejonami hydrofobowymi skierowanym na zewnątrz. Takie zachowanie soli kwasów tłuszczowych na granicy faz powoduje obniżenie napięcia powierzchniowego. Z tego względu mydła są dobrymi emulgatorami, tworząc trwałe emulsje tłuszczu z wodą, podobnie jak detergenty i kwasy żółciowe w przewodzie pokarmowym.

III. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

1. Pipety pasterowskie (10 szt.)
2. Pipety (2 szt./para 5 ml, 2 szt./para 10 ml) + nasadki
3. Probówki
4. Bagietka szklana

5. Zlewki
6. Bibuła
7. Pisaki/flamastry
8. moździerz

IV. ODCZYNNIKI

1. Chloroform
2. Eter dietylowy
3. Aceton
4. Etanol
5. Metanol
6. Mydło/ płyn do naczyń
7. 5% kwas octowy (ocet spirytusowy)
8. Aceton
9. Olej spożywczy lub oliwa
9. Woda
10. Zielone części roślin (liście)
11. Różne produkty spożywcze (orzechy, masło, jaja, suszone owoce itp.)

Uwaga!

1. Podczas wykonywania ćwiczenia należy zachować absolutną ostrożność! Ze względu na stosowane łatwo palne rozpuszczalniki organiczne używanie palników oraz innych źródeł otwartego ognia jest zabronione!

2. Zużyte lub niewykorzystane resztki rozpuszczalników organicznych należy wlewać do specjalnie oznaczonej kolby szklanej, a nie do zlewu!

V. WYKONANIE ĆWICZENIA

Badanie rozpuszczalności lipidów

Do probówek zawierających po 2 ml rozpuszczalników organicznych (metanol, etanol, eter dietylowy, chloroform) dodać kilka kropli oleju. Obserwować różnicę w stopniu rozpuszczalności tłuszczu w poszczególnych rozpuszczalnikach organicznych.

Tworzenie emulsji tłuszczu w obecności emulgatora

Do 2 probówek zawierających po 4 ml wody dodać kilka kropli oleju. Do jednej z nich dodać 0,5 ml roztworu mydła/płynu do naczyń. Zawartość probówek silnie wstrząsnąć. Zaobserwować różnicę w zachowaniu się tłuszczu w obecności i bez dodatku emulgatora.

Wykrywanie obecności tłuszczów w produktach spożywczych

Na niewielki bibułę/szary papier/papier pakowy papieru nanieśc kilka kropli wody (kontrola ujemna obecności tłuszczów) i kilka kropli oleju (kontrola dodatnia obecności tłuszczów). Odłóżyc do wyschnięcia. Sprawdź, kierując papierek w stronę źródła światła czy na papierze znajduje się tłusta plama (papier jest bardziej przeźroczysty i przepuszcza światło).

10 wybranych produktów spożywczych nanieść na bibułę/papier szary/papier w sposób przedstawiony powyżej. Sprawdzić czy znajdują się w nich tłuszcze.

UWAGA! W przypadku produktów spożywczych płynnych, należy nanieść kilka kropli badanego płynu na papier. Stałe i miękkie produkty spożywcze należy rozetrzeć, natomiast produkty stałe twarde należy rozgnieść lub zmiażdżyć za pomocą możdzieżą, tłuczka lub noża.

Zestawić w tabeli wyniki dla kontroli i wybranych produktów spożywczych. Czy w którymś z wybranych produktów obecność/brak tłuszczów stanowi zaskoczenie?

Rozdzielanie barwników flamastrów metodą chromatografii bibułowej

Na pasku bibuły, w odległości ok 1 cm od dolnej krawędzi, należy narysować kropki lub paski flamastrami o różnych kolorach. Do zlewki wlać 5% kwas octowy, tak by jego poziom sięgał ok 0,5 cm. Umieść bibułę w zlewce i pozostawić na jakiś czas aż do rozdzielenia się barwników. Wyciągnąć bibułę ze zlewki i wysuszyć „na płasko". Zaobserwować i opisać rozdział barwników.

Rozdzielanie barwników liści metodą chromatografii bibułowej

Liście należy rozetrzeć w moździerzu/miseczce/zlewce z odrobiną acetonu (aceton paruje, zatem można uzupełniać jego objętość podczas rozcierania). Po roztarciu liści powinno się uzyskać ciemnozielony roztwór (zawiesinę). Do zlewki przelać supernatant (resztki liści pozostawić w moździerzu). Poziom roztworu w zlewce powinien wynosić 3-5 mm. Umieść bibułę w szklance, tak by jej dolna krawędź była cała zanurzona w roztworze barwników. Pozostawić aż do widocznego rozdzielenia barwników (na żółty i zielony). Wyciągnąć bibułę ze szklanki i wysuszyć „na płasko". Zaobserwować i opisać rozdział barwników liści. Jakie barwniki udało się rozdzielić i są widoczne na chromatogramie?

VI. WYNIKI I WNIOSKI - SPRAWOZDANIE:

1. Temat ćwiczenia
2. Cel
3. Opisać obserwacje i wnioski dotyczące rozpuszczalności lipidów w rozpuszczalnikach polarnych i niepolarnych. Czy wynik doświadczenia jest zgodny z założeniami teoretycznymi?
4. Opisać obserwacje i wnioski dotyczące tworzenia emulsji w obecności emulgatora. Czy wynik doświadczenia jest zgodny z założeniami teoretycznymi?
5. Opisać wyniki doświadczenia wykrywania tłuszczy w różnych produktach spozywczych
6. Opisać obserwacje i wyniki z doświadczenia rozdziału barwników flamastrów za pomocą chromatografii bibułowej
7. Opisać obserwacje i wnioski z doświadczenia rozdziału barwników roślin zielonych za pomocą chromatografii bibułowej.

8. ROZDZIAŁ BARWNIKÓW LIŚCI METODĄ KOLUMNOWEJ CHROMATOGRAFII ADSORPCYJNEJ (ćwiczenie dodatkowe)

I. ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- ✓ Technika kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej.
- ✓ Barwniki uczestniczące w fotosyntezie (rodzaje, struktura, właściwości).
- ✓ Reakcje świetlne fotosyntezy (fotosystem I i II, kompleks antenowy, centrum reakcji fotosyntetycznej).
- ✓ Dokładna znajomość części doświadczalnej oraz umiejętność sprawnego przeliczania stężeń.

II. WSTĘP

Chromatografia adsorpcyjna jest techniką rozdziału mieszanin składników i wykorzystuje istnienie różnic w ich adsorpcji na granicy fazy stacjonarnej, zwanej adsorbentem i fazy ruchomej (ciekłej w chromatografii cieczowej lub gazowej w chromatografii gazowej). W chromatografii cieczowej fazę ruchomą, zwaną eluentem stanowią pojedyncze rozpuszczalniki lub ich kilkuskładnikowe mieszaniny. W skład eluentu mogą wchodzić także składniki rozdzielanej mieszaniny.

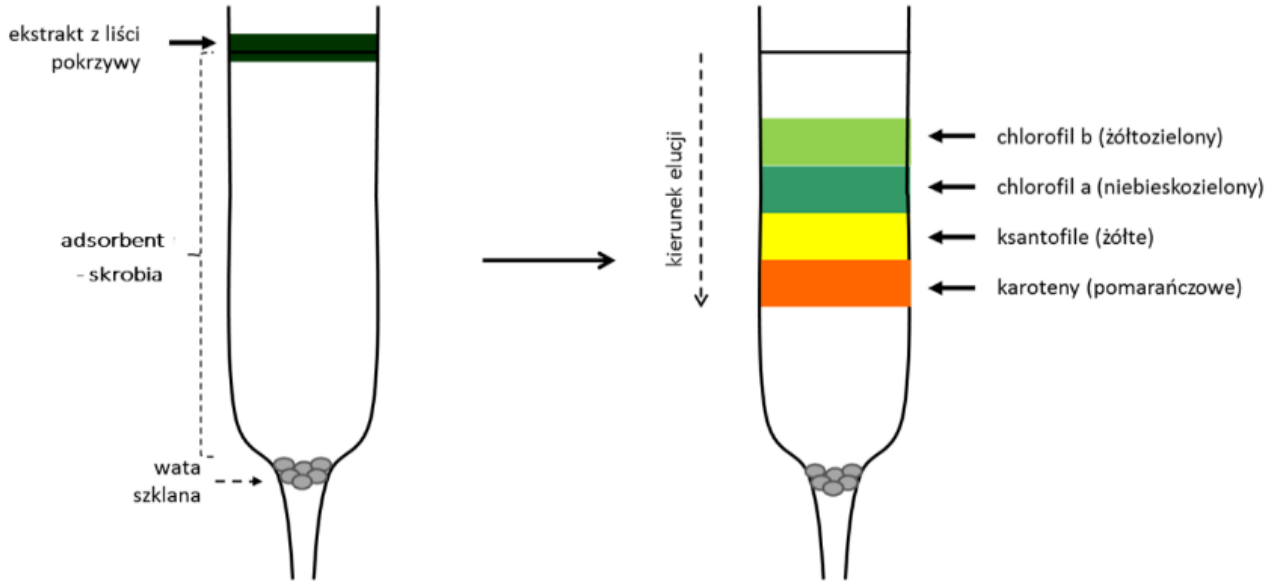
Ze względu na sposób wykonania chromatografię adsorpcyjną można przeprowadzić metodą kolumnową lub cienkowarstwową. Metoda kolumnowa jest wykorzystywana przede wszystkim do celów preparatywnych, natomiast cienkowarstwowa ma głównie zastosowanie analityczne.

Adsorpcja odbywa się przez selektywne zagęszczenie cząsteczek rozpuszczonej substancji (adsorbat) na powierzchni adsorbentu i zachodzi dzięki wzajemnym oddziaływaniom między adsorbentem a adsorbatem. Na rodzaj i siłę oddziaływań wpływa przede wszystkim charakter chemiczny powierzchni adsorbentu, stąd tak istotny jest jego dobór. Siła adsorpcji jest w rzeczywistości sumą oddziaływań takich jak oddziaływania van der Waalsa (dyspersyjne), elektrostatyczne, dipol-dipol, donorowo-akceptorowe oraz wodorowe. W chromatografii cieczowej oprócz oddziaływań adsorbent-adsorbat dochodzą oddziaływania z eluentem. Przy adsorpcji na adsorbentach polarnych siła elucji rośnie ze wzrostem polarności rozpuszczalnika. W przypadku adsorpcji na adsorbentach niepolarnych siła elucji zależy od niespecyficznych oddziaływań van der Waalsa i rośnie wraz ze wzrostem rozmiaru niepolarnych fragmentów cząsteczki rozpuszczalnika.

W chromatografii kolumnowej przepływ fazy ruchomej przez kolumnę wypełnioną adsorbentem można wymuszać grawitacyjnie lub stosując różnicę ciśnień na wlocie i wylocie kolumny. Cząsteczki składników rozdzielanej mieszaniny różnią się budową, co powoduje, że z różną siłą oddziałują z adsorbentem. W efekcie przemieszczają się z różną szybkością ku wylotowi kolumny; najszybciej eluowane są związki, które najsłabiej oddziałują z adsorbentem, najwolniej zaś te, które oddziałują z nim najsilniej.

Odparowanie rozpuszczalnika z odpowiednich porcji wycieku (frakcji) pozwala na uzyskanie czystych składników mieszaniny.

W trakcie ćwiczenia barwniki wyizolowane z liści pokrzywy będą rozdzielane metodą kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej z wykorzystaniem skrobi ziemniaczanej w roli adsorbentu. Chlorofile (a i b), ksantofile i karoteny różnią się strukturą i powinowactwem do adsorbentu, dlatego w trakcie rozdziału w obecności eteru naftowego przemieszczają się w kolumnie z różną szybkością (Rys. 1).



Rys. 1. Rozdział barwników liści pokrzywy metodą kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej. Faza stacjonarna (adsorbent) – skrobia, faza ruchoma (eluent) – eter naftowy.

Barwniki fotosyntetyczne (fotoreceptory)

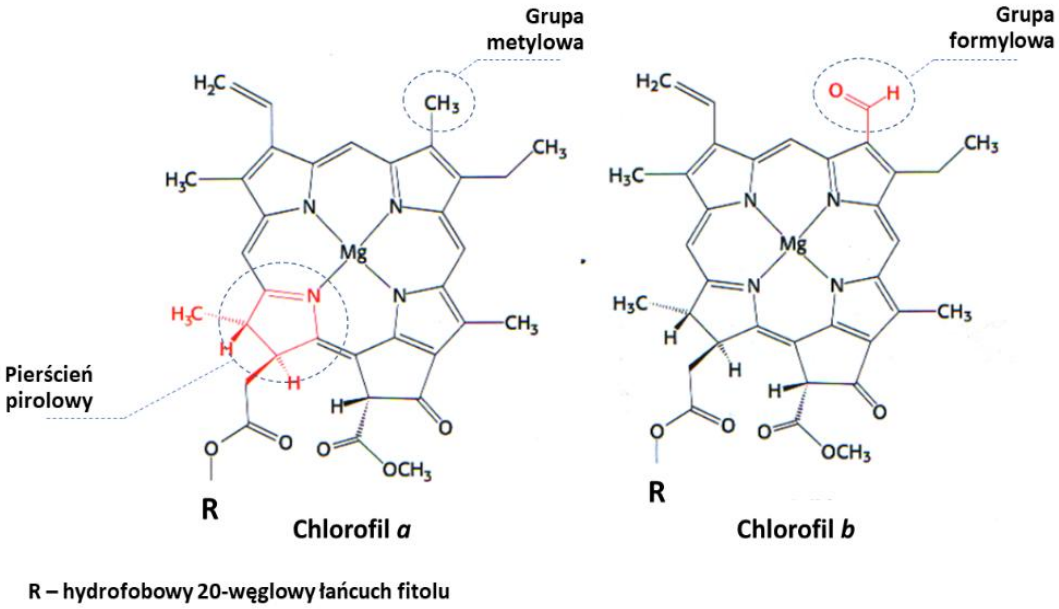
Pierwszym etapem fotosyntezy jest absorpcja światła przez cząsteczkę fotoreceptora. Głównym fotoreceptorem jest chlorofil. Chlorofil jest magnezoporfiryną, której atomy azotu czterech pierścieni pirolowych są połączone wiązaniami koordynacyjnymi z jonem magnezu. Jony magnezu mogą zostać wymienione na inne jony np. dwuwartościowe jony żelaza (zmiana barwy na szarobrunatną) bądź na jony cynku lub miedzi (zwiększenie stabilności cząsteczki i zachowanie zielonej barwy). Cząsteczka chlorofilu należy do nietrwałych. W podwyższonej temperaturze, w kwaśnym pH dochodzi do utraty jonów magnezu i zmiany barwy na oliwkowozieloną, natomiast w środowisku zasadowym hydrolizie ulegają wiązania estrowe obecne w cząsteczce chlorofilu.

Właściwości chlorofilu jako fotoreceptora wynikają z faktu, iż w układzie pierścieni pirolowych elektrony są zdelokalizowane, więc nie są przypisane do określonego atomu. Skutkiem tego jest możliwość tworzenia alternatywnych wiązań. Naprzemiennie występujące pojedyncze i podwójne wiązania tworzą układ wiązań sprzężonych w obrębie pierścieni pirolowych. Układ taki odpowiada za absorpcję

promieniowania świetlnego i powoduje, że chlorofil łatwo ulega wzbudzeniu, a molowe współczynniki absorpcji chlorofili należą do najwyższych oznaczonych dla związków organicznych.

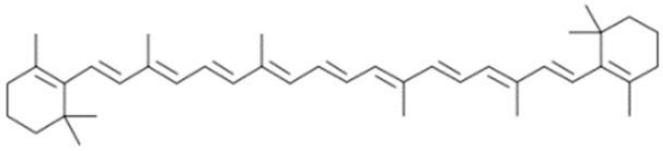
Rośliny zielone zawierają dwa rodzaje chlorofilu: chlorofil a i chlorofil b, różniące się nieznacznie strukturą i absorbujące światło przy innej długości fali. Pod względem budowy wspólną cechą jest obecność hydrofobowego, 20-węglowego łańcucha fitolu przyłączonego wiązaniem estrowym do jednego z pierścieni pirolowych, dzięki czemu cząsteczka chlorofilu jest zakotwiczona w błonie tylakoidu. Różnica w budowie między chlorofilami a i b wynika z obecności innej grupy funkcyjnej przy jednym z pierścieni pirolowych; w chlorofilu a występuje grupa metylowa, natomiast w chlorofilu b – grupa formylowa **(**Rys. 2**)**. Chlorofile silnie absorbują promieniowanie świetlne w zakresie światła niebieskiego i czerwonego, natomiast bardzo słabo w zielonej części spektrum. Ponadto, promieniowanie słabo absorbowane przez chlorofil a jest silnie absorbowane przez chlorofil b. Skutkiem tego chlorofile wzajemnie uzupełniają się w absorbcji promieniowania świetlnego, maja też inną barwę: chlorofil a – niebieskozieloną, chlorofil b – żółtozieloną.

Obok chlorofilu a i b u roślin zielonych, u części glonów występują chlorofile c i d, natomiast u bakterii fotosyntetyzujących zidentyfikowano bakteriochlorofile c, d i e.

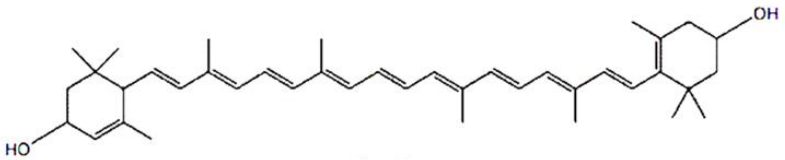


Rys. 2. Struktura chlorofilu a i b.

Karotenoidy to grupa ponad 600 barwników zidentyfikowanych u roślin. Pełnią funkcję barwników pomocniczych – absorbują światło i przenoszą energię wzbudzenia na cząsteczki chlorofilu. Barwniki te absorbują światło przy innych długościach fali niż chlorofil i w ten sposób, działając wspólnie, zwiększają skuteczność układu wychwytywania światła.



Beta-karoten



Luteina

Rys. 3. Wzory strukturalne najczęściej występujących karotenoidów: beta-karotenu oraz luteiny.

Pod względem struktury należą do poliizoprenoidów; osiem jednostek izoprenoidowych (jednostki 5- węglowe z wiązaniem podwójnym) tworzy liniowy układ sprzężonych wiązań podwójnych, w których elektrony są zdelokalizowane (podobnie jak w układzie pierścieni pirolowych chlorofilu). Z tego powodu karotenoidy, podobnie jak chlorofile łatwo absorbują promieniowanie. Do karotenoidów zaliczamy pomarańczowe karoteny i żółte ksantofile. Pod względem budowy karoteny to wyłącznie węglowodory, a najpowszechniej występującym jest beta-karoten (Rys. 3). Ksantofile posiadają przynajmniej jeden atom tlenu (w postaci grupy hydroksylowej, karbonylowej, karboksylowej lub hydroksymetylowej), stąd są bardziej polarne niż karoteny. Ksantofile absorbują promieniowanie o niższych długościach niż większość karotenów. Najpowszechniej występującym ksantofilem jest luteina.

Karotenoidy obok funkcji fotoreceptora pełnią rolę fotoprotekcyjną. Pochłaniają, a następnie rozpraszają energię wzbudzonych cząsteczek chlorofilu, zapobiegając powstawaniu tlenu singletowego.

Pochłanianie energii słonecznej zachodzi w fotosystemach. Każdy fotosystem zawiera kompleks antenowy i centrum reakcji fotosyntetycznej. Kompleks antenowy składa się z kilku tysięcy cząsteczek chlorofilu i barwników pomocniczych wspólnie zgrupowanych w błonie tylakoidu.

W fazie świetlnej fotosyntezy foton powoduje wybicie elektronu w cząsteczce chlorofilu a (należącej do tzw. pary specjalnej w centrum reakcji fotosyntetycznej) na wyższy poziom energetyczny. Elektron zostaje następnie przekazany na odpowiedni akceptor w łańcuchu transportu elektronów. Dodatni ładunek w cząsteczce chlorofilu a pary specjalnej jest zobojętniany przez elektron, który pochodzi z cząsteczki wody. Fotony światła wzbudzają elektrony również w cząsteczkach chlorofili a i b oraz barwnikach pomocniczych (karotenoidach: karotenach i ksantofilach) znajdujących się w kompleksach antenowych otaczających centrum reakcji fotosyntetycznej. W tym przypadku absorpcja fotonu nie wywołuje jednak transferu elektronu, ale tzw. przeniesienie energii rezonansu (przeniesienie ekscytonu) do centrum reakcji.

Jeżeli po absorpcji fotonu przez cząsteczkę barwnika nie następuje transfer elektronu lub przeniesienie energii rezonansu (np. w trakcie wzbudzania chlorofilu w roztworze przez światło UV) to wzbudzona

cząsteczka powraca do stanu podstawowego, czemu towarzyszy fluorescencja. Ponieważ część energii ulega rozproszeniu, światło fluorescencji ma dłuższą falę niż foton wzbudzający cząsteczkę. W trakcie fotosyntezy przekształcanie fotonów w energię chemiczną jest bardzo wydajne, dlatego fluorescencja chlorofilu *in vivo* jest znacznie niższa niż w roztworze (3% – 9% absorbowanej energii świetlnej).

W praktyce pomiar fluorescencji chlorofilu *in vivo* pozwala ocenić wydajność aparatu fotosyntetyzującego.

III. APARATURA I SZKŁO LABORATORYJNE

1. Szklane kolumny chromatograficzne (1 szt./ grupa)
2. Cylindry miarowe (25 ml, 100 ml po 2 szt. / grupa; umieścić pod wyciągiem)
3. Zlewki (250 ml - 2 szt.)
4. Probówki (20 ml - 7 szt.)
5. Pipeta 5 ml + nakładka na pipetę do 10 ml w każdym zestawie
6. Bagietki szklane
7. Wata szklana
8. Pipety pasterowskie
9. Spektrofotometr + 2 szklane kuwety
10. Strzykawka 2 ml + długa igła (1 lub 2 /grupa)

IV. ODCZYNNIKI

1. Wyciąg z liści pokrzywy (1 ml wyciągu uzyskany z 1 g liści)
2. Eter naftowy do rozdziału chromatograficznego
3. Skrobia
4. Aceton

V. WYKONANIE ĆWICZENIA

Chromatografia kolumnowa

Na dnie kolumny chromatograficznej umieścić mały fragment waty szklanej. Kolumnę umieścić pionowo w statywie, zamknąć jej wylot zaciskaczem. Skrobię (ok. 20g) zalać w zlewce mieszaniną rozpuszczalników do chromatografii (ok. 25 ml eteru naftowego) tak, aby utworzyła się jednorodna zawiesina, którą energicznym ruchem należy wlać do kolumny. Otworzyć wylot kolumny w celu jej upakowania. Zamknąć kolumnę, gdy nad powierzchnią złoża pozostanie 0,2 - 0,3 cm warstwa rozpuszczalnika. Nanieść 2 ml ekstraktu barwników po ściankach, tuż nad powierzchnią adsorbenta (ostrożnie, aby nie

uszkodzić złoża). Po całkowitym wchłonięciu ekstraktu przez adsorbent kolumnę uzupełnić eterem naftowym i rozwijać do momentu wyraźnego rozdziału barwników (35-50 min). W trakcie rozdziału należy uzupełniać kolumnę eterem naftowym tak, aby jego warstwa nad złożem nie była mniejsza niż 1 cm (eter uzupełniać ostrożnie, po ściankach, aby nie uszkodzić złoża). Po rozdziale wysuszyć adsorbent - poczekać aż z adsorbenta wypłyną resztki eteru naftowego, a następnie umieścić kolumnę na 15-20 min w cieplarce o temp. 60-70°C.

Adsorbent z rozdzielonymi barwnikami ostrożnie umieścić na czystej bibule. Wyciąć prążki - niebieskozielony (chlorofil a) i żółtozielony (chlorofil b), chlorofile przenieść do osobnych probówek i rozpuścić w 5 ml acetonu. Po 5 min delikatnie zlać supernatant i zmierzyć absorbancję chlorofilu a przy 663 nm i chlorofilu b przy 645 nm.

Obliczyć stężenie chlorofilu a i b znając właściwy współczynnik absorpcji (a) dla chlorofili:

- Chlorofil a : $84\ \frac{l}{g \times cm}$
- Chlorofil b : $51{,}8\ \frac{l}{g \times cm}$

Stężenie chlorofilu $c[g/l] = \frac{\boldsymbol{A}}{\boldsymbol{a}\left[\frac{l}{g \times cm}\right] \times \boldsymbol{d}[cm]}$

gdzie: A – Absorbancja

d – grubość warstwy pochłaniającej (grubość kuwety – 1 cm)

a – właściwy współczynnik absorpcji

Obliczyć ile chlorofilu a i b przypada na 1g suchych liści pokrzywy (wyniki podać w %) zakładając, że 1 ml wyciągu otrzymano z 1g liści (należy pamiętać, że chlorofil *a* i *b* uzyskany z 1 ml ekstraktu przed pomiarem rozcieńczono w 5 ml acetonu).

Obejrzeć pod lampą UV roztwory chlorofilu *a* i *b*.

VI. WYNIKI I WNIOSKI - SPRAWOZDANIE:

1. Temat ćwiczenia
2. Cel ćwiczenia
3. Obserwacje dotyczące rozdziału barwników liści pokrzywy (kolory i grubości prążków, stopień rozdzielenia substancji).
4. Przedstaw obliczenia i wyniki (ile chlorofilu a i b przypada na 1g suchych liści). Czy wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi? Czym może być spowodowana odmienna ilość chlorofilu a i b w liściach pokrzywy?

WZORY

Stężenie normalne

Stężenie normalne jest to liczba gramorównoważników substancji zawarta (rozpuszczona) w 1 dm^3 roztworu.

$$C_n = \frac{z}{V_r} \quad [gR/dm^3]$$

$$z = \frac{m_s}{gR} \quad , \quad gR = \frac{M}{w} \quad , \quad n = \frac{m_s}{M}$$

$$C_n = \frac{z}{V_r} = \frac{m_s}{gR \times V_r} = \frac{m_s \times w}{M \times V_r} = \frac{n \times w}{V_r}$$

Stężenie procentowe

Stężenie procentowe roztworu jest to liczba gramów substancji zawarta w100 gramach roztworu, wyrażona w % (procentach)

$$C_p = \frac{m_s}{m_r} \times 100\%$$

$$m_r = m_s + m_a$$

$$C_p = \frac{m_s}{m_s + m_a} \times 100\%$$

Stężenie molowe

Stężenie molowe jest to ilość moli substancji rozpuszczonej w 1 dm^3 roztworu.

$$\boldsymbol{C_m = \frac{n}{V_r}} \quad [mol/dm^3]$$

$$n = \frac{m_s}{M}$$

$$C_m = \frac{m_s}{M \times V_r}$$

Oznaczenia:

Cn – stężenie normalne [N]

Cp – stężenie procentowe

Cm – stężenie molowe [mol/dm^3]

m_s – masa substancji rozpuszczonej [g]

m_r – masa roztworu [g]

m_a – masa rozpuszczalnika [g]

z - liczba gramorównoważników substancji [gR]

gR - gramorównoważnik substancji

w – wartościowość

V_r - objętość roztworu [dm^3]

M - masa molowa (mola) substancji [g/mol] ([g])

n – liczba moli [mol]

Gęstość substancji

$$d = \frac{m_s}{V} \text{ [g/dm}^3\text{]}$$

Mieszanie roztworów

Mieszanie roztworów o znanym stężeniu procentowym

Cp_1 → Cp_x → $|Cp_x - Cp_2|$ (ilość jednostek <u>masowych</u> roztworu Cp_1)

Cp_2 → Cp_x → $|Cp_x - Cp_1|$ (ilość jednostek <u>masowych</u> roztworu Cp_2)

Mieszanie roztworów o znanym stężeniu molowym

Cm_1 → Cm_x → $|Cm_x - Cm_2|$ (ilość jednostek <u>objętościowych</u> roztworu Cm_1)

Cm_2 → Cm_x → $|Cm_x - Cm_1|$ (ilość jednostek <u>objętościowych</u> roztworu Cm_2)

Zmiana stężenia roztworu (rozcieńczanie)

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C_1 – stężenie początkowe danej substancji

C_2 – stężenie końcowe danej substancji

V_1 – objętość początkowa danej substancji

V_2 – objętość końcowa danej substancji