

Katedra biochemie

Laboratorní technika

KBC/LABT

Kolektiv autorů
Olomouc 2021

Obsah

Úvod	5
Laboratorní řád.....	5
Bezpečnost práce v chemické laboratoři	6
První pomoc při nehodě.....	7
Nebezpečné látky v chemické laboratoři:	8
Laboratorní sklo.....	9
Laboratorní plasty	10
Chemické nádobí a aparatury	11
Zdroje tepla v chemické laboratoři	13
Vakuum a jeho zdroje.....	14
Měření teploty.....	14
Voda v biochemické laboratoři	15
Chemikálie a jejich uchovávání	16
Doporučená literatura:.....	17
1. Základní úkony v biochemické laboratoři	18
Váhy a vážení.....	18
Měření objemu kapalin	19
Příprava pufrů a měření pH.....	21
Obecné zásady práce při zacházení s elektrodou.....	24
Příprava roztoků	24
ÚKOL Č. 1: Určete průměrnou hmotnost a chybu měření váženého předmětu.....	25
ÚKOL Č. 2: Práce s automatickou pipetou.....	26
ÚKOL Č. 3: Ředění zásobního roztoku manganistanu draselného.	27
ÚKOL Č. 4: Příprava 200 ml 0,1 mol·l ⁻¹ Tris/acetátového pufru o pH 8.0.....	28
ÚKOL Č. 5: Příprava 100 ml 0,2 mol·l ⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7,0.....	29
2. Spektrofotometrická měření	30
Spektrofotometrie v biochemii	30
Odvození Lambert-Beerova zákona	31
Určování koncentrace roztoků pomocí absorpční spektrofotometrie.....	32
Jednopaprskové přístroje	32
Dvoupaprskové přístroje	33
Spektrofotometry na principu diod-array-detectors (DAD).....	33
Kalibrační funkce	34
Kalibrační funkce a stanovení koncentrace pomocí spektroskopie	35

Korelační koeficient R.....	36
Koeficient determinace R^2	36
Možné problémy	36
Důležitá pravidla při stanovení koncentrace analytu ve vzorku pomocí kalibrační funkce	37
Rozsah kalibrace, koncentrace analytu	37
Technické replikáty.....	37
Ředění.....	37
ÚKOL Č. 1: Spektrofotometrické stanovení koncentrace roztoku síranu nikelnatého	38
ÚKOL Č. 2: Praktická aplikace spektrofotometrie v biochemické laboratoři, stanovení obsahu proteinů Bradfordovou metodou s vazbou barviva Coomassie blue.....	39
1. Příprava roztoků	40
2. Stanovení proteinů ve zkumavkovém uspořádání na stolním spektrofotometru	40
3. Gelová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě	42
Chromatografické metody	42
Adsorpční chromatografie.....	42
Rozdělovací chromatografie.....	42
Afinní chromatografie	43
Chromatografie na iontoměničích	43
Gelová chromatografie.....	44
Chromatografie na koloně.....	46
Chromatografie na tenké vrstvě.....	46
ÚKOL Č. 1: Gelová chromatografie proteinu s nízkomolekulární látkou.....	49
ÚKOL Č. 2: Chromatografie karotenoidů z papriky na tenké vrstvě.....	51
4. Elektromigrační metody.....	54
Elektroforetická pohyblivost	54
Elektroforéza v biologických vědách	55
Elektroforéza DNA	57
Elektroforéza proteinů	57
Potravinářská barviva.....	58
ÚKOL Č. 1: Gelová elektroforéza potravinářských barviv.....	59
5. Extrakce, filtrace, sublimace a práce s vakuovou odparkou	62
Extrakce	62
Filtrace.....	63
Sublimace	65
Odpařování ve vakuu.....	66
Stanovení bodu tání	67

ÚKOL Č. 1: Izolace kofeinu z čaje a jeho přečištění sublimací	68
ÚKOL Č. 2: Analytický důkaz přítomnosti kofeinu	70
ÚKOL Č. 3: Stanovení teploty tání kofeinu	71
6. Izolace nukleových kyselin	73
Úprava biologického materiálu	73
Mletí	73
Homogenizace	73
Centrifugace	74
Nukleové kyseliny	76
Izolace nukleových kyselin	77
Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin	78
ÚKOL Č. 1: Izolace DNA z vepřové sleziny a RNA z pekařských kvasnic	79
ÚKOL Č. 2: Důkaz nukleových kyselin	80
ÚKOL Č. 3: Spektrální stanovení koncentrace nukleových kyselin	82
7. Destilace	83
Destilace za normálního tlaku	84
Destilace s vodní párou	85
ÚKOL Č. 1: Izolace hřebíčkové silice z hřebíčku destilací s vodní parou	86
8. Úprava biologického materiálu, precipitační techniky, dialýza, centrifugace, ultrafiltrace	90
Úprava biologického materiálu	90
Precipitační metody	90
Tepelná denaturace nežádoucích látek	90
Vysolování biopolymerů neutrálními solemi	91
Srážení biopolymerů ostatními látkami	92
Dialýza	93
Ultrafiltrace	93
ÚKOL č. 1: Homogenizace semen ječmene, precipitace jejich proteinů síranem amonným s následnou dialýzou (a teoretickou ultrafiltrací na zařízení Amicon)	96
ÚKOL č. 2: Stanovení amonných iontů reakcí s Nesslerovým činidlem	99
ÚKOL Č. 3: Stanovení obsahu proteinů Bradfordovou metodou	99
9. Titrace	101
Určení bodu ekvivalence	101
Vizuální indikace	101
Instrumentální indikace	102
Metody titračního stanovení a používané indikátory	104
Acidobazické titrace	104

Komplexotvorné titrace.....	104
Srážecí titrace	104
Oxidačně-redukční titrace	105
Příprava titračních činidel.....	105
Vitamín C	106
ÚKOL Č. 1: Jodometrické stanovení kyseliny askorbové.....	108
ÚKOL Č. 2: Důkaz přítomnosti vitamínu C.....	109
10. Základy práce s mikroskopem	112
Světelná mikroskopie	112
Složení světelného mikroskopu (obr. 1).....	112
Číselná apertura	114
Základní pravidla mikroskopování.....	115
Údržba mikroskopu	116
Mikroskopický preparát a objekt	116
Příprava čerstvého preparátu.....	116
Příprava trvalého preparátu	116
Příprava tenkých řezů.....	117
Specifická barvení preparátů.....	117
ÚKOL Č. 1: Stavba rostlinné buňky, plasmolýza, deplasmolýza, plasmoptýza.....	118
ÚKOL Č. 2: Charakterizace jednoděložných a dvouděložných rostlin	119
A. Pozorování průduchů	119
B. Pozorování rostlinných pletiv a cévních svazků listu.....	120
C. Pozorování uspořádání cévních svazků ve stonku rostliny	121
11. Mikroskopie a buněčný cyklus.....	123
Buněčný cyklus	123
Interfáze	124
Mitóza (M-fáze)	125
Cytokineze	126
Mikroskopické pozorování chromozomů.....	126
ÚKOL Č. 1: Pozorování fází buněčného cyklu	127

Úvod

Laboratorní řád

1. Student je před zahájením práce v laboratoři povinen seznámit se s laboratorním řádem, s bezpečnostními předpisy a s poskytováním první pomoci.
2. Student je povinen přicházet do laboratoře včas a řádně připraven. Musí mít provedeny potřebné výpočty, znát vlastnosti látek, se kterými bude pracovat apod. Před zahájením cvičení vyučující ověřuje znalosti studentů. Pokud student nemá dostatečné znalosti k řešení dané úlohy, cvičení vykoná v náhradním termínu.
3. Každá absence musí být omluvena. Má-li student vážné osobní důvody, pro které se nemůže zúčastnit cvičení, sdělí to vedoucímu předem. Každá zameškaná úloha musí být nahrazena. Na termínu náhradního cvičení se student dohodne s vedoucím cvičení.
4. Při práci v laboratoři musí mít student pracovní plášť a vhodnou obuv.
5. Studenti pracují ve dvojicích. Před zahájením práce zkontrolují podle přiloženého seznamu pracovní stůl a jeho vybavenost. Všechny závady zjištěné před zahájením práce nebo v jejím průběhu neprodleně hlásí vedoucímu cvičení.
6. Při práci je nutné postupovat přesně podle zadané úlohy a pokynů vyučujícího. Před používáním přístrojů se musí student nejprve seznámit s jejich obsluhou.
7. Průběh práce a dosažené výsledky si každý student zaznamenává do protokolárního sešitu. Po skončení cvičení předloží výsledky vedoucímu cvičení.
8. Následující cvičení odevzdává každý student vypracovaný protokol, který musí obsahovat: jméno studenta, studijní kombinaci, datum, název úlohy, stručný princip úlohy, stručný pracovní postup, výsledky, diskusi a závěr (tabulky, grafy).
9. Po skončení práce je student povinen dát své pracovní místo do pořádku, řádně umýt sklo a opláchnout je destilovanou vodou.
10. Student smí opustit laboratoř až po kontrole dosažených výsledků a stavu pracovního stolu vyučujícím.
11. Po skončení práce je povinnost uzavřít vodu a vypnout elektrické spotřebiče.
12. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.
13. Studenti jsou povinni dodržovat bezpečnostní předpisy.
14. Práce s jedovatými, těkavými a páchnoucími látkami se provádí pouze ve spuštěné digestoři.
15. Zvláštní opatrnosti je třeba dbát při manipulaci s otevřeným ohněm, hořlavinami, žíravinami a jedovatými látkami.
16. Případné závady, nedostatky, nehody nebo poranění je nutné ihned hlásit vyučujícímu a v případě potřeby poskytnout okamžitě první pomoc.
17. Práce v chemické laboratoři je zakázána těhotným anebo kojícím ženám a matkám do konce 9. měsíce po porodu. Studentka je povinna vedoucímu cvičení okamžitě oznámit graviditu, kojení či nedávný porod.

Bezpečnost práce v chemické laboratoři

1. Provádějte pouze práce podle pokynů vyučujícího a pracovního návodu.
2. Seznamte se s rozmístěním hasicích přístrojů a s únikovými východy z laboratoře.
3. V laboratoři nikdy nejezte, nepijte a nekuřte. Po skončení práce si důkladně umyjte ruce.
4. K jídlu a pití (mimo laboratoř) nepoužívejte nikdy chemické sklo.
5. Tašky a oblečení uložte do skříní mimo laboratoř.
6. Při práci v laboratoři vždy noste pracovní plášť a vhodnou obuv.
7. Neprovádějte samovolné opravy nebo úpravy na elektrické instalaci a přístrojích.
8. Chemikálie nikdy nezkoušejte ústy a neinhaluje výpary.
9. Nepipetujte ústy.
10. Při práci se žiravinami a jinými nebezpečnými látkami si chraňte obličej a oči ochranným štítem, ruce gumovými rukavicemi.
11. Na pracovišti udržujte pořádek a čistotu. Dbejte, abyste vnější stěny nádob nebo pracovní místo nepotřísnili chemikáliemi.
12. Koncentrované kyseliny a zásady ředte tak, že kyselinu nebo zásadu nalijete tenkým proudem po tyčince do vody za současného míchání a chlazení.
13. Při provádění pokusů ve zkumavkách držte ústí zkumavek odvrácené od obličeje (svého i spolupracovníků).
14. Při práci s hořlavinami nesmí být v blízkosti otevřený oheň. Při destilaci hořlavin je nezbytné z okolí odstranit zásobní láhve hořlavin a kontrolovat průtok vody chladičem. Hořlaviny nikdy nezahříváte přímým plamenem, používejte lázně nebo topná hnízda.
15. Zvýšenou pozornost věnujte hlavně manipulaci s hořlavinami I. třídy, které mají teplotu vzplanutí do 21°C (aceton, ether, methanol, ethanol, benzín, benzen a toluen).
16. Pokud vypukne požár, je každý povinen pokusit se ho zdolat vlastními silami (hasicím přístrojem, improvizovanými hasicími prostředky). Je nutno dále vypnout elektrický proud a pokusit se odstranit z okolí požáru hořlavé látky (zejména kapaliny) a nádoby se stlačenými plyny. Nelze-li požár zvládnout vlastními silami, je nutné neprodleně volat hasiče (tel. číslo 150).
17. Střepy a jiné odpadky s ostrými hranami musí být odkládány do nádob zvlášť k tomu určených.
18. Zbytky jedů a organických rozpouštědel likvidujte podle pokynů vyučujícího.
19. Při práci s etherem dbejte úzkostlivě na bezpečnostní opatření (možnost vznícení i od horkých součástí).
20. V případě nehody okamžitě informujte vyučujícího a poskytněte první pomoc. Vedoucímu cvičení je třeba hlásit i každé nepatrné poranění, bolesti hlavy, hučení v uších apod. Ve všech případech je nutno sepsat protokol o poranění pro případ pozdějších komplikací.

První pomoc při nehodě

Při poleptání kůže silnou zásadou nebo kyselinou zasažené místo ihned důkladně omyjte proudem vody.

Při zasažení oka chemikálií ihned oko vypláchněte slabým proudem vody.

Při poleptání sliznice v ústech proveďte důkladný výplach úst vodou.

Při požití louhu se doporučuje pít zředěnou kyselinu octovou ($0,5 - 2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), při požití kyseliny pijte suspenzi oxidu hořečnatého nebo hydroxidu hlinitého ve vodě. Po požití jedů je charakter první pomoci specifický podle druhu otravy, doporučuje se vypít aspoň 0,5 l vody a vyvolat zvracení. Vždy je nutné vyhledat odborné lékařské ošetření!

Hořící oděv haste přikrývkou nebo sprchovou vodou. Při likvidaci větších plamenů použijte hasicí přístroje. Při malých popáleninách ošetřete postižené místo mastí na spáleniny a zakryjte sterilním obvazem. Větší popáleniny ošetří lékař!

Při pořezání sklem odstraňte z povrchové rány sklo, okolí otřete zředěným peroxidem vodíku (3%) a ovažte sterilním obvazem. Větší zranění ošetří lékař!

Nebezpečné látky v chemické laboratoři:

Tab. 1: Seznam některých nebezpečných látek používaných v tomto cvičení.

Název	GHS	První pomoc
Amoniak	GHS05, GHS07, GHS09	Při požití: vypláchnout ústa, nevyvolávat zvracení Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, opláchnout vodou Při vdechnutí: přenést na čerstvý vzduch, poloha usnadňující dýchání Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)
Benzen	GHS02, GHS07, GHS08	Při požití: okamžitě volat toxikologické informační středisko / lékaře, nevyvolávat zvracení Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, omýt dostatečným množstvím vody a mýdla Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)
Difenylamin	GHS06, GHS08, GHS09	Při požití: okamžitě volat toxikologické informační středisko / lékaře, nevyvolávat zvracení Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, omýt dostatečným množstvím vody a mýdla Při vdechnutí: přenést na čerstvý vzduch, poloha usnadňující dýchání Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)
Dusičnan stříbrný	GHS03, GHS05, GHS09	Při požití: vypláchnout ústa, nevyvolávat zvracení Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, opláchnout vodou Při vdechnutí: přenést na čerstvý vzduch, poloha usnadňující dýchání Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)
Fenol	GHS05, GHS06, GHS08	Při požití: okamžitě volat toxikologické informační středisko / lékaře, nevyvolávat zvracení Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, omýt dostatečným množstvím vody a mýdla Při vdechnutí: přenést na čerstvý vzduch, poloha usnadňující dýchání Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)
Chloroform	GHS06, GHS08	Při požití: vyvolat zvracení (do 1 hod od požití), po 5 minutách podat 10-20 rozdrcených tablet aktivního uhlí rozmíchaných ve vodě, volat lékaře Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, opláchnout vodou Při vdechnutí: přenést na čerstvý vzduch, poloha usnadňující dýchání Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	Při požití: okamžitě volat toxikologické informační středisko / lékaře, vypláchnout ústa vodou Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, opláchnout vodou Při vdechnutí: přenést na čerstvý vzduch, poloha usnadňující dýchání Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)
Octan olovnatý	GHS08, GHS09	Při požití: volejte lékaře, konzultujte nutnost lékařského ošetření Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, opláchnout vodou Při vdechnutí: přenést na čerstvý vzduch, poloha usnadňující dýchání Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)
Žíraviny obecně (kyseliny, louhy)	GHS05	Při požití: nevyvolávat zvracení, vypláchnout ústa Při styku s kůží: kontaminované oblečení svléknout, opláchnout vodou Při vdechnutí: přenést na čerstvý vzduch, poloha usnadňující dýchání Při zasažení očí: několik minut vyplachovat vodou (vyjmout čočky)

Laboratorní sklo

Mezi laboratorní sklo se řadí veškerý skleněný materiál, se kterým se setkáváte v chemické laboratoři. Laboratorní sklo má vysokou odolnost k minerálním kyselinám a zásadám. Z fyzikálních vlastností skla je nejdůležitější jeho tepelná roztažnost. Obecně mají skla měknoucí při vyšších teplotách větší odolnost proti náhlým tepelným změnám. V laboratoři se můžete setkat především se třemi druhy skla:

- 1) **Sklo měkké – sodno-draselno-vápenaté** se používá na výrobu nádobí, které není vystavováno tepelnému namáhání. Má velký koeficient roztažnosti, takže nesnese kolísání teploty. Musí se zahřívat nebo ochlazovat velmi opatrně. Má nízký bod tání, a proto se dá snadno roztavit v plameni nad kahanem. Změklé sklo se pak dá lehce opracovávat.
- 2) **Sklo tvrdé – borosilikátové** slouží na výrobu skleněného nádobí, které se může zahřívat nad plamenem. Zhotovuje se z něj veškeré varné a odměrné sklo. Borosilikátové sklo má nazelenalou barvu a vyznačuje se odolností proti praskání, vysokým bodem tání a vysokou chemickou odolností. Nejběžnější obchodní značky jsou Sial, Simax, Duran či Pyrex.
- 3) **Sklo křemenné** – se vyznačuje vysokou chemickou a tepelnou odolností. Je však velice křehké a využívá se pouze ke zhotovování speciálních nádob a zařízení, např. kyvet pro spektrofotometrii (propouští UV záření).

Obecnou vlastností skla je jeho křehkost. Zbytečnému praskání zamezíte řádným uchycením do svorek a lapáků s čelistmi s korkovou výztuží, popř. s navlečenými gumovými hadičkami. Při práci s agresivními látkami či ve vakuu není vhodné používat korek a gumové hadice. Zde se pak pracuje se zábrusovým sklem, které se dá vzájemně stavebnicově propojovat. Zábrusové baňky, chladiče, teploměry, zátky atd. jsou normalizované. Nejčastější rozměry zábrusů jsou NZ 14,5/15; NZ 29/32; NZ 40/45 (čísla znamenají průměr zábrusu v mm v zúžené a širší části). Práce se zábrusy je rychlá a pohodlná. Zábrusy je však třeba vždy řádně promazat silikonovou vaselinou, aby nedocházelo k jejich „zatuhnutí“.

Vedle skleněného nádobí se v chemické laboratoři velice často používá též nádobí a pomůcek z porcelánu (třecí a odpařovací misky, žíhací kelímky, váženky, lžičky, Büchnerovy nálevky aj.). Tvrdý chemický porcelán má vysokou mechanickou a chemickou odolnost. Je citlivý na úder a lehce se třítí hlavně při prudkých změnách teploty. Je stálý proti vzdušnému kyslíku i za žáru, vodu povrchově neváže a je v ní i za vysokých teplot nerozpustný. Chemickým činidlům vzdoruje asi stejně dobře jako chemické sklo. Chemický porcelán může být drsný či glazurovaný. Glazura jeho vlastnosti nijak výrazně neovlivňuje.

Chemické nádobí je třeba ihned po práci vyčistit, dokud nečistoty a zbytky chemikálií na stěnách ještě nezaschly. Zpravidla si vystačíte s postupy známými z domácnosti, tj. použitím saponátového prostředku a důkladné omytí vodou. V laboratoři však nezapomeňte na poslední krok, kterým je řádné vypláchnutí destilovanou vodou. Pokud na stěnách ulpěly kousky ve vodě nerozpustných nečistot, použijte mechanických pomůcek, jako jsou kartáče, útržky filtračního papíru nebo jemný písek. Toto mechanické čištění však nesmí sklo poškrábat, i nepatrné škrábnutí může způsobit při zahřívání prasknutí skla. Když ani mechanické čištění nevede k odstranění nečistot, přichází na řadu chemické čištění. Použijte rozpouštědlo, které čištěný materiál nekoroduje a ve kterém je nečistota rozpustná. Nejčastěji se využívají v laboratoři dostupné minerální kyseliny. Při této činnosti dbejte na dodržování bezpečnostních předpisů a používejte ochranné pomůcky. Vysokou čistící schopnost má tzv. kyselina chromsírová, což je dichroman sodný rozpuštěný v koncentrované kyselině sírové. Sklo se do této směsi namočí přes noc a ráno se pak důkladně opláchne v roztoku detergentu, pod tekoucí vodou a nakonec ve vodě destilované. Chromsírová směs se po čase vyčerpá, což se projeví zeleným zbarvením (redukce dichromanu na ion chromitý). Taková směs je pak málo účinná a musí se připravit nová.

Zvláštní nároky jsou kladeny na sklo používané v molekulárně biologické laboratoři, kde se velice často pracuje s bakteriálními kmeny a jinými mikroorganismy a je velké riziko bakteriální kontaminace z okolí. Proto je snaha o to používat pro manipulaci s těmito organismy pouze sterilní plasty na jedno použití. Pokud je nutno použít skleněné či jiné dražší nádoby, musí se předem sterilizovat ve speciálních tlakových nádobách (autoklávech) a následně vysušit v sušárně na 105°C. Zvláštní péče je pak věnována sklu, které se používá pro manipulaci s RNA. Hrozí totiž nebezpečí kontaminace ribonukleasami, což jsou degradační enzymy RNA, které jsou velice stabilní a odolávají i běžné sterilizaci. Sklo se proto před sterilizací namáčí do roztoku jejich inhibitoru diethyl pyrokarbonátu.

Laboratorní plasty

Vedle laboratorního skla a porcelánu se v chemické laboratoři můžete čím dál tím častěji potkat s laboratorními plasty – centrifugační zkumavky (falkony), kyvety, mikrozukavky a další. Tyto plasty se liší svým složením, proto se vyznačují rozdílnou mechanickou, teplotní a chemickou odolností, na což je před použitím daného plastu brát zřetel. Nejčastěji se setkáte s následujícími plasty:

- 1) **Polyethylen (PE)** je nejnámějším termoplastem. Rozlišujeme dva druhy PE:
 - a. **LDPE** (Low-density PE) – stálý vůči bezkyslíkatým kyselinám, zásadám a solím, při vyšších teplotách se rozpouští v organických rozpouštědlech, nestálý vůči aromátům a chlorovaným uhlovodíkům; dlouhodobě snese teploty do 80 °C, krátkodobě do 95 °C, mechanické vlastnosti si udržuje do -40 °C.
 - b. **HDPE** (High-density PE) – vyznačuje se vyšší mechanickou pevností než LDPE, lze jej použít v rozmezí teplot -50 °C až 200 °C.

Centrifugační zkumavky bývají obvykle vyrobeny z LDPE, proto je třeba dbát na rozsah teplot, ve kterých pracujete. Tyto falkony také obvykle nejde sterilizovat autoklávováním, ale lze je sterilizovat použitím ethylenoxidu, chemicky pomocí formalinu nebo γ -zářením.

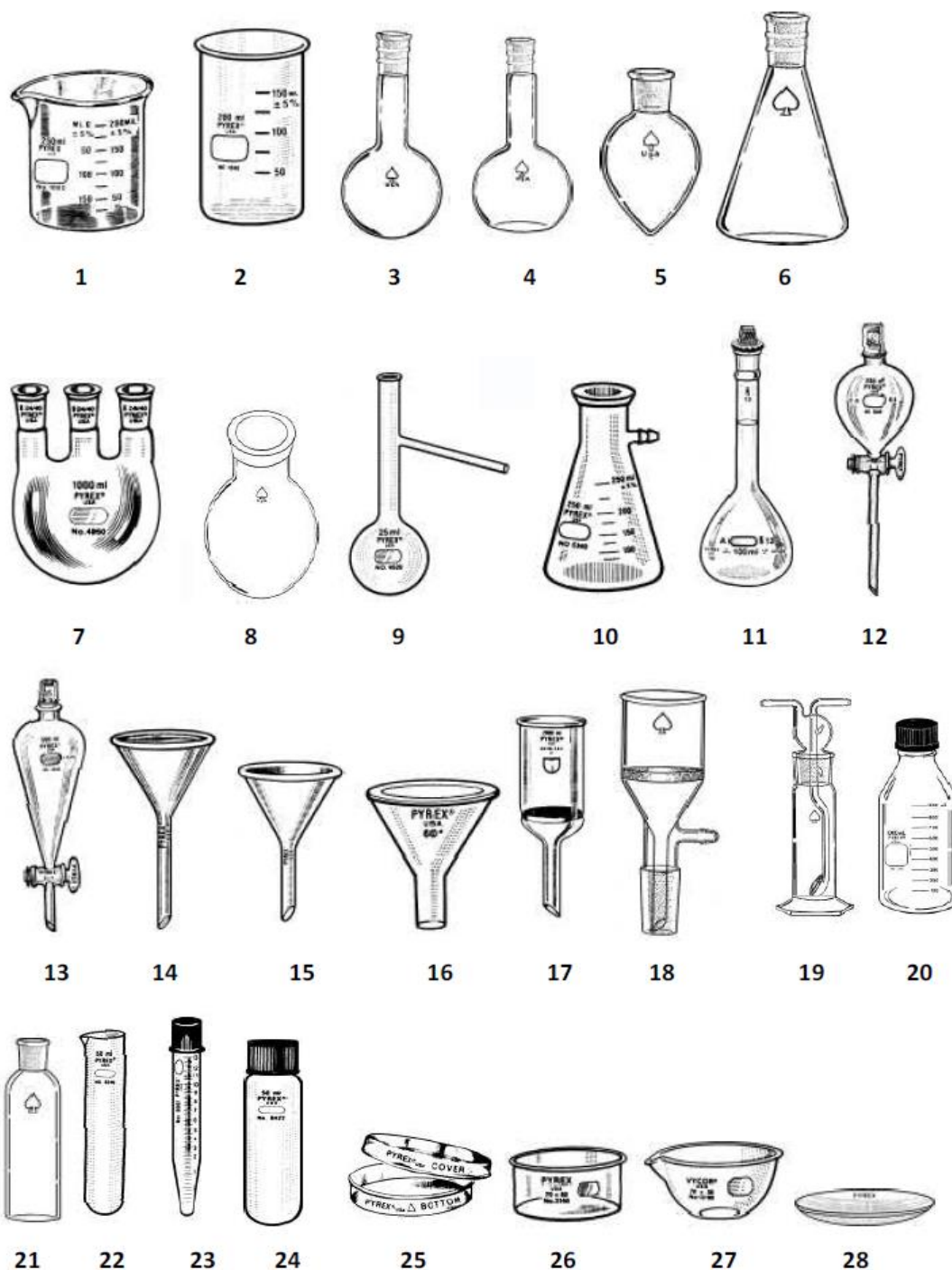
- 2) **Polypropylen (PP)** má velmi dobrou chemickou a mechanickou odolnost. Plasty z PP lze použít v rozmezí teplot -10 °C až 121 °C, lze je autoklávovat, sterilizovat ethylenoxidem nebo chemicky formalinem, je třeba brát v potaz, že při nižších teplotách PP plast křehne. PP plasty jsou odolné vůči olejům, organickým rozpouštědlům, alkoholům, nelze použít na oxidující kyseliny, xyleny, tetrahydronaftalen. Z PP se vyrábí většina centrifugačních zkumavek a mikrozukavek.
- 3) **Polystyren (PS)** je poměrně tvrdý, ale křehký plast, citlivý na náraz, je odolný vůči kyselinám a zásadám, není odolný vůči organickým rozpouštědlům. Plasty z PS jsou citlivé vůči UV-záření, málo odolné vůči teplotě – snesou maximální teplotu do 80 °C, při 90 °C měknou, stárnutím křehnou, mohou se vytvořit trhliny. Z polystyrenu je vyrobena většina plastů ke kultivaci mikroorganismů a tkáňových kultur (Petriho misky, kultivační lahve, ...), zkumavky, spektrofotometrické kyvety a další. Co se spektrofotometrických kyvet týká, ty lze použít pouze ve viditelné části spektra.
- 4) **Polymethylmetakrylát (PMMA)** je relativně drahý termoplast, má dobré mechanické vlastnosti, je odolný vůči zředěným kyselinám a zásadám (v koncentrovaných se rozpouští), rozpouští jej aromatické a chlorované uhlovodíky, estery, ketony, ethery. Tepelně odolný je PMMA v rozsahu teplot -40 °C až 85 °C, má nízkou povrchovou odolnost, snadno se poškrábe (problém zvláště u spektroskopii). Propustnost PMMA zasahuje i do UV-oblasti, proto lze kyvety z PMMA používat pro UV-spektroskopii.

Chemické nádobí a aparatury

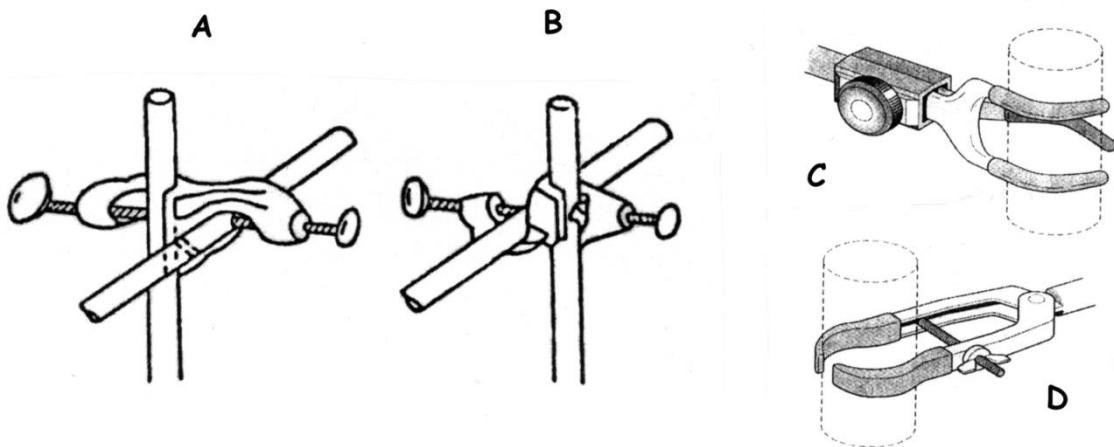
Mezi základní vybavení každé chemické laboratoře patří baňky a kádinky (Obr. 1). **Kádinky** mají rovné dno a na horním okraji mohou mít zobáček. Mohou být i kalibrovány, ale tato kalibrace slouží pouze k orientačním účelům, rozhodně podle ní nelze odměřovat přesné objemy. **Baňky** mají tvar členitější, rozdělený na vlastní baňku a hrdlo (Obr. 1). Dno mohou mít jak rovné, tak kulaté, ty se pak používají hlavně pro práci za sníženého tlaku. Baňky a kádinky jsou převážně tenkostěnné, jednou z výjimek je silnostěnná baňka odsávací. Slouží k filtraci za sníženého tlaku a je určena pouze k tomuto účelu, v žádném případě v ní nelze provádět jakékoliv chemické reakce, plnit horkými kapalinami nebo zahřívat. Baňka konického tvaru se nazývá **Erlenmeyerova** (Obr. 1). Baňku s postranním tubusem nazýváme **frakční** (Obr. 1).

Slovem **nálevka** označujeme v laboratoři větší počet pomůcek. Obyčejné nálevky slouží k přelévání kapalin a jednoduchým filtracím (Obr. 1). Pro urychlení filtrace se používají nálevky s žebrovaným vnitřním povrchem nebo dlouhým a úzkým stonkem. Tzv. **dělicí nálevky** (Obr. 1) se používají k řadě procesů, jako je extrakce, sušení, přikapávání atd. Velmi často používaná je **Büchnerova nálevka** vyrobená z porcelánu, která má dírkované dno, na které se při filtraci vkládá kolečko filtračního papíru. Podobně vypadají i **skleněné frity** (Obr. 1), které mají místo dírkovaného dna sintrované sklo propouštějící rozpouštědla. Zábrusové láhve na čištění plynů se nazývají **promývačky**. **Zásobní láhve** na chemikálie se dělí podle typu hrdla na reagenční láhve se šroubovacím víkem, sloužící především k uchování kapalin, a širokohrdlé se zábrusovou zátkou, tzv. **prachovnice**, ve kterých přechováváme pevné látky. K přechovávání malých množství pevných látek používáme **lékovky**. Protáhlá neuzavíratelná skleněná nádoba se nazývá **zkumavka** (Obr. 1), slouží k provádění chemických reakcí v malých objemech. V poslední době jsou velmi populární plastové zkumavky se šroubovacím uzávěrem. Nádoby podobného tvaru, většinou také šroubovací, používáme k centrifugaci a nazýváme je **kyvety** (Obr. 1). Bývají zhotovovány většinou z tvrzených plastů. **Hodinová skla** slouží k přihrávání nádob, k sušení, vážení a přenášení vzorků pevných látek (Obr. 1). Analogicky můžeme využívat i dvoudílné **Petriho misky** (Obr. 1), jež se používají hlavně pro kultivace mikroorganismů. **Odpařovací misky** bývají většinou vyrobeny z porcelánu (Obr. 1). Nejsou vhodné k přímému zahřívání v plamenu stejně jako misky krystalizační. Pro odpařování roztoku používáme vždy vodní lázeň. K drcení a roztírání pevných vzorků slouží **třecí misky s tloučkem** (Obr. 1). Jediným porcelánovým nádobím, které snáší přímý oheň, jsou **žihací kelímky** (Obr. 1).

Chemické sklo většinou nepoužíváme samostatně, ale sestavujeme ho do různých aparatur, např. aparatura na destilaci, sublimaci apod. Aparatury sestavujeme na kovových stojanech nebo kovových klecích. Na svislé tyče stojanů a klecí připevňujeme **kruhy**, **svorky** nebo **držáky pomocí svorek** (Obr. 2). Na kovové kruhy zpravidla pokládáme **azbestové sítky**, na které stavíme kádinky v případě jejich zahřívání kahanem. Kruhy pro zahřívání nikdy nezaměňujeme s kruhy filtračními, které jsou vyloženy dřevěnou nebo umělohmotnou vložkou a slouží k držení nálevky při filtraci nebo dělicí nálevky při dělení kapalin. Kruh na stojanu se často nahrazuje trojnožkou. K upevnování skleněných součástí malého průměru používáme tzv. **klemy**, což jsou držáky s malým obvodem ramen. Pro uchycování chladičů pak používáme **chladičové držáky s velkým rozpětím ramen**. **Klemy a držáky se nesmějí nikdy dotýkat skleněných částí aparatury přímo kovem. Bývají vyloženy korkem nebo potaženy gumovou hadicí.** Při sestavování jakékoli aparatury musíme dbát na to, aby v aparatuře nenastalo pnutí, které by při zahřátí vedlo k prasknutí některé ze skleněných součástí. **Při sestavování aparatury ze zábrusového skla nikdy neopomeneme zábrusy řádně promazat vazelínou.**



Obr. 1: Laboratorní nádobí. 1 – kádinka s výlevkou; 2 – kádinka bez výlevky; 3 – destilační baňka se zábrusem a kulatým dnem; 4 – destilační baňka se zábrusem a plochým dnem; 5 – hruškovitá baňka; 6 – Erlenmeyerova baňka se zábrusem; 7 – baňka trojhrdlá; 8 – titrační baňka; 9 – frakční baňka; 10 – baňka odsávací; 11 – odměrná baňka; 12 – dělicí nálevka kulovitá; 13 – dělicí nálevka hruškovitá; 14 – nálevka s dlouhým stonkem; 15 – nálevka s krátkým stonkem; 16 – násypka; 17 – Büchnerova nálevka; 18 – skleněná fritra pro vakuovou filtraci; 19 – promývačka; 20 – láhev se šroubovacím uzávěrem; 21 – úzkohrdlá zábrusová láhev; 22 – zkumavka; 23 – zkumavka se šroubovacím uzávěrem; 24 – centrifugační kyveta; 25 – Petriho miska; 26 – krystalizační miska; 27 – odpařovací miska; 28 – hodinové sklo.



Obr. 2: Sestavování aparatur. A – nesprávné uchycení křížové spojky; B – správné uchycení křížové spojky; C – chladičový držák; D – klema.

Zdroje tepla v chemické laboratoři

V laboratořích, do kterých je zaveden plyn, může jako zdroj pro zahřívání sloužit plynový kahan. Kahan je jednoduché zařízení sloužící k tvorbě směsi vzduchu a plynu, která se spaluje a vytváří na konci trubice plamen. Podle způsobu, jakým je k plynu přiváděn a mísen vzduch, rozlišujeme **tři typy kahanů: Bunsenův, Tecluhů a Mékerův.** Pokud je do plynu přiváděno dostatečné množství vzduchu, hoří nesvítlivým plamenem, který je výhřevnější než plamen svítivý, jež získáme zamezením přívodu vzduchu. Z toho plyne pravidlo, že čím více vzduchu smísíme s plynem, tím výhřevnější plamen získáme. U Bunsenova a Mékerého kahanu se přívod vzduchu reguluje otáčením pohyblivého prstence, který odkrývá nebo zakrývá otvory v těle kahanu. Kahany zapalujeme vždy při uzavřeném přívodu vzduchu. V laboratoři často narazíme i na kahan lihový, který má daleko nižší výhřevnost než kahany plynové. Výhodou však je jeho velikost a jednoduchost. Lze ho použít všude tam, kde potřebujeme vzorky či chemické reakce jen zahřát. Používá se hlavně při zkuškových reakcích a pro sterilizaci materiálu při práci s mikroorganismy.

V současné době se jako hlavní zdroje tepla v chemických laboratořích využívají **elektromagnetické míchačky s ohřevem, elektrické vařiče a topná hnízda.** Na elektrický vařič pokládáme vždy azbestovou sítku. Topná hnízda používáme hlavně na zahřívání destilačních baněk. Topné hnízdo je elektrický vařič, u kterého je elektricky vyhřívána speciální tkanina vytvarovaná do polokoule tak, aby obalila destilační baňku. Existuje několik typů topných hnízd podle velikosti zahřívané baňky. U topného hnízda lze kromě regulace příkonu většinou regulovat i to, zda je vyhřívána pouze spodní část baňky, nebo baňka celá. Při práci s topnými hnízdy je třeba dávat pozor na to, aby do hnízda nevnikla kapalina (voda). Dojde-li k tomu, je třeba přístroj okamžitě odpojit od přívodu napětí!

Protože každé přímé zahřívání klade vysoké nároky na materiál nádob, je výhodné předávat teplo zdroje prostřednictvím různých lázní. **Podle materiálu, který tvoří podstatu lázně, je možné dělení na vzdušné, vodní, olejové, pískové, kovové a solné.** Vzdušné lázně se moc často nepoužívají vzhledem k tomu, že vzduch je ze všech materiálů nejméně vodivý. Nejjednodušší formou vzdušné lázně je prázdná kovová nádoba zahřívána kahanem nebo vařičem. Nejčastěji používaná je lázeň vodní, která je vhodná k zahřívání látek až do bodu varu vody a k destilaci kapalin vroucích přibližně do 80 °C. Nejjednodušší vodní lázní je obyčejný hrnec, který je vyhříván elektrickým vařičem. V laboratoři se lze setkat i se

speciálními vodními lázněmi, které mají různě nastavitelné otvory pro zahřívání odlišných velikostí baněk a odpařovacích misek. Pro zahřívání nad teplotu varu vody se nejčastěji používají lázně olejové. Náplň může být buď olej minerální, který lze použít do teploty 250 °C, nebo silikonový použitelný až do teplot okolo 400 °C. Vzhledem k teplotní roztažnosti je nutno olejem naplnit nádobu sloužící jako obal lázně jen asi do poloviny, jinak by při zvýšení teploty mohl olej přetéci. Při zahřívání je nutno do olejové lázně vždy vložit teploměr a průběžně kontrolovat teplotu, aby nedošlo k jejímu přehřátí. Obvykle platí, že teplota lázně, má být o 20-30 °C vyšší než žádaná teplota reakční směsi. Je důležité, aby se do olejové lázně nedostala voda. Při teplotě nad 100 °C by pak došlo k prskání a pění oleje, který by mohl způsobit popáleniny osobě pracující s lázní nebo požár. Solné a kovové lázně slouží k zahřívání nad 300 °C. Používá se směs několika solí, např. dusičnan sodný a draselný o bodu tání 219 °C a nízkotající slitiny, jako je Woodoův kov s bodem tání 65 °C. Vždy je však důležité vyjmout baňku před ztuhnutím lázně. Výhodou těchto lázní je vysoká tepelná vodivost použitých materiálů. Od používání písečných lázní se v dnešní době už v podstatě ustoupilo.

K žihání a tavení většího množství látek slouží **elektrické odporové pece**. Pro syntézy v proudu plynu nebo reakce ve vakuu užíváme pece trubkové, pro žihání v kelímcích nám slouží kelímkové pícky a pro tavení většího množství látek pece muflové.

Vakuum a jeho zdroje

V laboratorní praxi je velmi často třeba pracovat za sníženého tlaku – hlavně při destilaci, filtraci či sušení, kde snížení tlaku výrazně ovlivňuje těkavost látek. **Vakuum je stav uzavřeného prostoru, ve kterém je tlak plynu nebo páry nižší než tlak atmosférický okolního prostředí.**

Zařízení vytvářející vakuum nazýváme **vývěvou**. V laboratoři se můžeme setkat s vývěvami několika typů, které se liší tlakem, proti kterému čerpají, mezní hodnotou vakua a sacím výkonem. Nejjednodušším typem vývěvy je vývěva vodní. Jedná se o zúženou trubici, kterou tryská proud vody. V okolí ústí trysky je vzduch strháván ve směru proudu vody a je zde napojena odvodná hadice, která se druhým koncem napojuje na evakuovanou aparaturu. Vodní vývěva pracuje tedy přímo proti atmosférickému tlaku. Mezní tlak vakua je dán tenzí vodní páry (pro vodu o teplotě 10 °C to je 1333 Pa). Mezi vodní vývěvou a aparaturu vždy zařazujeme **pojistnou nádobu (promývačku)**, aby nedošlo při poklesu tlaku vody v potrubí ke vniknutí vody do aparatury. Vývěvy dále mohou být rotační olejové nebo mechanické, jejich konstrukce je již složitější. Základním stavebním prvkem rotační olejové vývěvy je rotor se šoupátkem, které rozdělují prostor mezi rotorem a pláštěm na dvě části. Otáčením rotoru se jeden prostor zvětšuje a nasává vzduch a druhý prostor se zároveň zmenšuje a vzduch je vytlačován za součinnosti ventilu z vývěvy. Hlavním pravidlem při práci s vývěvou je, že vždy po skončení práce nejdříve znovu zavzdušníme aparaturu a až poté vypneme zdroj vakua. Zabráníme tím vniknutí vody do aparatury či nasátí agresivních látek do vývěvy a její poškození.

Měření teploty

Pro měření teploty byla přijata mezinárodní teplotní stupnice, definovaná pomocí bodu tuhnutí vody a varu vody. Další pevné body mezinárodní stupnice jsou: bod varu síry (444,6 °C), bod tání stříbra (960,8 °C) a bod tání zlata (1062,4 °C). Všechny tyto teploty jsou definovány za atmosférického tlaku jedné atmosféry. **Teplota se měří teploměry, které mohou být trojího typu: dilatační, odporové a termočlánky.**

Dilatační teploměry využívají roztažnosti kapalných, popřípadě pevných či plynných látek. Nejčastěji používané jsou teploměry rtuťové. Dovolují měřit teplotu od $-38,9\text{ °C}$ do 650 °C . Pro měření nízkých teplot se teploměry plní toluenem (-80 °C až 100 °C), ethanolem (-100 °C až 70 °C), petroletherem (-150 °C až 120 °C) či pentanem (-190 °C až 20 °C). Pro vyšší teploty se pak používá jako náplň kapalné galium (do 1000 °C) a cín (do 1500 °C).

Odporové teploměry využívají závislosti odporu vodiče na teplotě. Těmito teploměry lze měřit teplotu s přesností na tisícinu stupně.

Termočlánky jsou založeny na termoefektu – dva dráty ze dvou různých kovů spojené na obou koncích dávají vznik elektrického proudu, jsou-li oba spoje udržovány na rozdílné teplotě. Příkladem nejčastěji používaných termočlánků jsou články měď – konstantan (do 600 °C), železo – konstantan (do 900 °C) a platina – platinarhodium (do 1600 °C).

Voda v biochemické laboratoři

Vzhledem k tomu, že obyčejná tekoucí voda obsahuje značné množství solí, je pro jakékoliv pokusy v biochemické laboratoři nepoužitelná. Používáme ji pouze tehdy, když nepřichází do styku s ostatními reagensy (jako rozpouštědlo), např. pro chlazení.

Základním způsobem úpravy vody je **demineralizace**. Dříve byla každá biochemická laboratoř vybavena vlastní destilační aparaturou, pomocí které se opakovanou destilací z vody odstraňovaly nežádoucí ionty. Tento způsob demineralizace vody (zvláště pokud bylo třeba připravit větší objem takto upravené vody) byl značně neekonomický, proto se začaly používat aparatury pro čištění vody pomocí **reverzní osmózy**. Tímto způsobem se z vody odstraní většina iontově aktivních látek a křemíku ve formě SiO_2 . Demineralizovaná voda (často chybně označovaná jako destilovaná) se v laboratoři používá spíše jako technická voda pro oplachy, přípravu některých roztoků, ale pro některé speciální účely nemusí být její čistota vhodná, protože stále obsahuje některé kationty.

Pro speciální účely, např. v laboratoři molekulární biologie, kde vadí i sebemenší kontaminace vody, se používá voda **deionizovaná**, která se ještě následně sterilizuje v autoklávu. Příprava deionizované vody je založená na kombinaci několika separačních metod vedoucích k odstranění jednotlivých skupin kontaminantů. Souprava je většinou složená z dílčích separátorů odstraňujících hrubší nečistoty (filtry), ionty (iontoměniče), nepolární látky (adsorbent) a jako poslední bývá zapojen membránový filtr. Většina nynějších aparatur pracuje na principu reverzní osmózy. Jednotlivé filtry je však nutno po několika měsících provozu vyměňovat a příprava deionizované vody proto není levnou záležitostí.

Hlavním kritériem čistoty vody je její specifická vodivost. U běžně destilované vody se pohybuje okolo hodnoty $10\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Deionizovaná voda pak mívá tuto hodnotu ještě o řád nižší. Připravená destilovaná či deionizovaná voda se skladuje převážně v plastových nádobách. Skleněné nádoby nejsou pro dlouhodobější uskladnění vhodné, jelikož se do vody zpětně uvolňují některé kationty. Pokud to podmínky dovolují, je lepší skladovat vodu v chladu a ve tmě, čímž se zabrání možné kontaminaci autotrofními mikroorganismy.

Chemikálie a jejich uchovávání

Jako výchozí látky pro práci v laboratoři se používají většinou průmyslově vyráběné chemikálie opatřené štítkem od výrobce, který udává základní informace o dané chemikálii. Ke každé chemikálii náleží také bezpečnostní list, který musí být uložen na pracovišti.

Chemikálie jsou dodávány výrobcem ve vhodném obalu, proto je vhodné tyto chemikálie dále nerozdělovat do obalů jiných. Pokud je to nutné, vždy použijte vhodný obal a dodržujte základní pravidla – zvláště pak důsledné označení nových obalů. Látky kapalné uchovávejte v láhvích s dvojitým uzávěrem. Látky hygroskopické chraňte proti vzdušné vlhkosti utěsněním víčka, např. parafilmem. Hydroxidy a jejich roztoky se nesmí skladovat v zábrusových lahvích. Látky citlivé na světlo skladujte v tmavých nádobách a ve tmě. Skladování chemikálií v laboratoři má svůj pevný řád, který vychází z bezpečnostních pravidel, a proto vždy používanou chemikálii vracejte na původní místo. Usnadníte tím i práci kolegům, kteří budou s danou chemikálií následně pracovat. Důraz je kladen především na hořlaviny a látky výbušné, které nikdy nesmí být uskladněny pohromadě ve větším množství. Jedy se skladují ve speciálních uzamčených železných skříních v uzamčené místnosti. Pozor je třeba dávat také na uskladnění těkavých látek v uzavřených prostorách (lednice), je třeba je skladovat tak, aby nedocházelo k uvolňování jejich par.

Na štítku chemikálie je především její název, sumární vzorec, množství, čistota a molekulová hmotnost. Dále musí být uvedeny důležité fyzikální vlastnosti a bezpečnostní informace (Obr. 3, 4). U pevných látek bývá uvedená forma např. krystalický (*crystalisatum*), bezvodý (*anhydricum*), práškový (*pulveratum*). Podle rostoucí čistoty (tzn. klesajícího obsahu nečistot) chemikálie dělíme na:

1) technické chemikálie

- a) surové (*crudum*)
- b) technické (*technicum*)
- c) čištěné (*purum*)

2) čisté chemikálie

- a) čisté (*purissimum*)
- b) pro analýzu (*p.a.*, *per analysis*) – v laboratořích se nejčastěji používají tyto
- c) chemicky čisté (*purissimum speciale*)

Chemikálie o vyšší čistotě jsou pak označeny přímo účelem, pro který slouží, např. pro UV spektrofotometrii, molekulární biologii atd. S čistotou chemikálií však prudce roste jejich cena, proto chemikálie o vysoké čistotě používáme jen pro tyto speciální účely a je-li to nezbytně nutné.

Výrobce — **PENTA** Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., IČ: 020 96 013
VÝROBA A PRODEJ ČISTÝCH, FARMACEUTICKÝCH A SPECIÁLNÍCH CHEMIKáliÍ
Radiová 1122/1, 102 00 Praha 10; info@pentachemicals.eu, tel.: +420 228 060 697

Název chemikálie — **METHYLALKOHOL p.a.** Údaj o čistotě

Sumární vzorec — **CH₃OH M. 32,04**
a molekulová hmotnost Indexové číslo: 603-001-00-X

H- a P-věty

Pokyny pro likvidaci obalu

Objem — **1000 ml**

Číslo šarže — **č. šarže: 2101250116**
Retest date: 01/2021

Katalogové číslo — **1000 ml = 791 g Obal GL 72**
Katalogové číslo: 21210-11000

Nebezpečí

RID/ADR: UN 1230 3/OS II

Specifikace:

Obsah	min.	99,8%
Netěkavé látky	max.	0,001%
Kyselost (j. HCOOH)	max.	0,002%
Voda	max.	0,08%
Bod vzplanutí		11°C
Bod varu		64-65°C
Index lomu		1,329

Výstražné symboly nebezpečnosti

Signální slovo

Informace o čistotě a fyzikální vlastnosti

Obr. 3: Příklad štítku chemikálie firmy Penta.



Obr. 4: Výstražné symboly nebezpečnosti chemikálií dle Globálního harmonizovaného systému klasifikace a hodnocení chemikálií.

Doporučená literatura:

Peč, P. a kol.: Laboratorní cvičení z biochemie, Vydavatelství UP Olomouc, 2000.

Káš, J. a kol.: Laboratorní cvičení z biochemie, Nakladatelství Olomouc, 2000.

Ferenčík, M. a kol.: Biochemické laboratorní metody, Alfa Bratislava, 1981.

Procházka, S. a kol.: Fyziologie rostlin, Academia Praha, 1998.

Dey, P.M. a kol.: Plant Biochemistry, Academia Press London, 1997.

Nováček, F.: Praktikum z rostlinné cytologie a histologie se základy mikroskopické techniky, Vydavatelství UP Olomouc, 1982.

Knoz, J. a Opravilová, V.: Základy mikroskopické techniky, Vydavatelství MU Brno 1992.

Ruzin, S. E.: Plant microtechnique and microscopy, Oxford University Press, 1999.

http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev00/00files_e.html - informace o GHS na stránkách Evropské hospodářské komise OSN

1. Základní úkony v biochemické laboratoři

Váhy a vážení

Ke stanovení váhového množství látky se v chemické laboratoři používají váhy. Princip vážení je znám po staletí: jde o srovnávací metodu, kdy se srovnává neznámá hmotnost nějakého předmětu (navažovací lodička, mikrozkuhavka se vzorkem) se známou hmotností standardu (závaží). Mechanické zařízení řešilo toto srovnání pomocí docílení rovnováhy na páce a mělo tvar známých miskových vah, které vešly v obecné povědomí i jako symbol používaný pro zobrazování spravedlnosti. Až donedávna byly i nejpřesnější analytické váhy postaveny na stejném principu a vážení obsahovalo postupné přidávání závaží různé (i velmi malé) velikosti. Takový postup byl samozřejmě zejména pro začátečníky velmi zdoluhavý a možnosti chyb četné.

V současné době patří všechny formy dvoumiskových vah historii a v laboratoři se setkáte výhradně s vahami jednomiskovými, které používají promítací stupnice na stínítko a jsou zapojeny do elektrické sítě. Existují dva rozdílné typy vah lišící se **váživostí**, tzn. maximální hmotností, kterou můžete vážit, a **přesností**, se kterou na nich můžete hmotnost stanovit:

- 1) **Váhy technické** mají podle provedení váživost od 100 g do několika kilogramů. Přesnost nebývá větší než $5 \cdot 10^{-2}$ g.
- 2) **Váhy analytické** (Obr. 1A) mají váživost obvykle 100 g a přesnost v řádu 10^{-4} g.

K orientačnímu zjištění hmotnosti předmětů, které budete dále vážit přesněji, a k zjišťování výtěžků čistících operací se používají tzv. **předvážky** (Obr. 1B). Slouží k vážení předmětů do 200 g s přesností $\pm 0,1$ g. V dnešní době se už používají převážně elektronické typy s digitálním displejem. Jejich forem je řada a procházejí stále vývojem od jednodušších s mechanicko-elektrickým snímačem hmotnosti přes snímače, kdy je měřen elektrický signál potřebný k vrácení misky po zatížení do nulové polohy pomocí servomotorku, až k snímačům tenzometrickým.

Pro veškeré vážení platí základní pravidlo: chemikálie (kapalné ani pevné) nesmí přijít do přímého styku s miskami vah! Veškerá manipulace s chemikáliemi (přidávání a ubírání) se musí provádět zásadně mimo váhy. Případné nečistoty na vahách je třeba okamžitě odstranit štětečkem!!!



Obr. 1: Váhy v biochemické laboratoři. A – analytické váhy; B – předvážky.

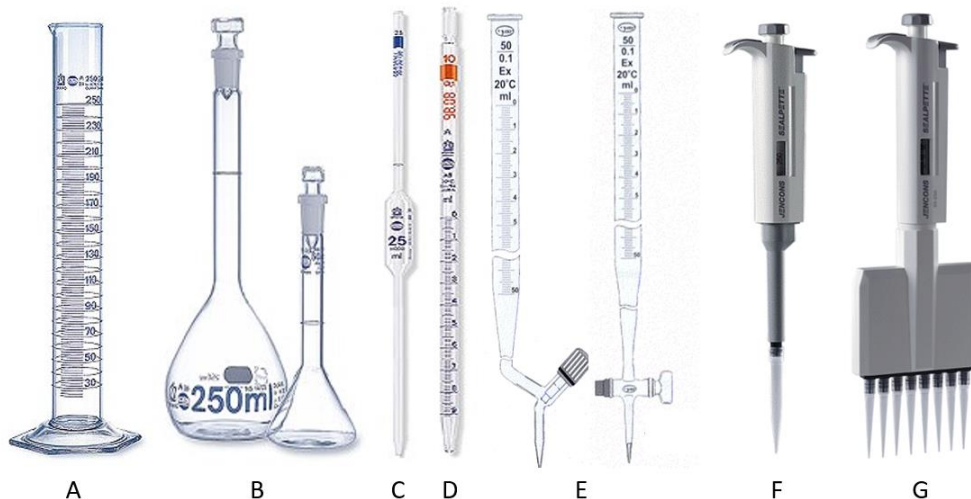
Měření objemu kapalin

K odměřování objemů kapalin slouží **odměrné válce, pipety, byrety a odměrné baňky** (Obr. 2). Odměrné válce (Obr. 2A) se používají jen k přibližnému odměřování kapalin. Na přesnější měření objemů se používají pipety (buď pouze pro určitý objem, Obr. 2C, nebo dělené, Obr. 2D) a byrety, u nichž je možno kohoutkem nebo pomocí tlačky regulovat vytékání kapaliny (Obr. 2E). Všechny tyto nádoby jsou kalibrovány na „vylití“, to znamená, že z nich vyteče přesně vyznačený objem. Při plnění pipet je třeba vždy dbát na to, aby ústí pipety bylo stále ponořeno pod hladinou kapaliny. Při jeho vynoření nad hladinu dochází k nasátí vzduchu do pipety. Při odečítání je nutno mít oko ve stejné úrovni se značkou. Odečítáme vždy spodní okraj menisku.

Pro pipetování kapalin vždy používáme speciální násadky či gumové balónky, nikdy nepipetujeme ústy!!!

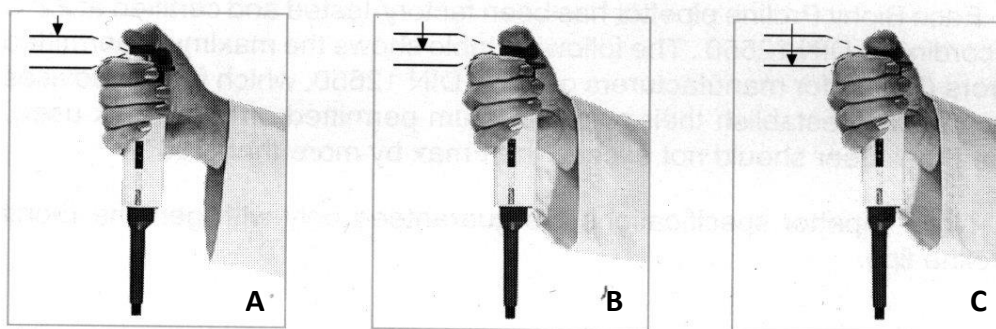
Jelikož je pipeta kalibrována na vylití, nikdy se nevyfukuje, ale její obsah se nechá pouze vytéct a její špička se otře o dno nebo o stěnu nádoby, do které kapalinu odměřujeme.

V současné době se v biochemické či molekulárně biologické laboratoři se skleněné pipety téměř nepoužívají, plně je nahradily **pipety automatické** (Obr. 2F, G) umožňující přesnější a pohodlnější odměření daného objemu. Jsou vhodné i pro pipetování mikrolitrových objemů. Automatické pipety jsou vyráběny pro různé rozsahy objemů (nejčastěji 1-5 ml, 200-1000 μ l, 20-200 μ l, 2-20 μ l, 0,5-10 μ l a 0,1-2,5 μ l). Objem se nastavuje otočením šroubu na stupnici. Nasávání a vypouštění kapaliny přes nasaditelnou špičku je ovládáno pístem, který má tři polohy – klidovou, pro nasávání a pro vypouštění (Obr. 3).



Obr. 2: Pomůcky k měření objemů.

A – kalibrováný odměrný válec; B – odměrné baňky; C – pipeta; D – pipeta dělená; E – byrety; F – automatická pipeta; G – automatická pipeta multikanálová.

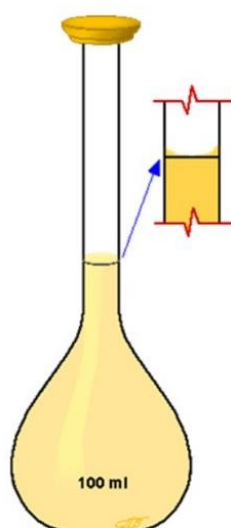


Obr. 3: Polohy automatické pipety při nasávání a vypouštění kapaliny.

A – klidová poloha; B – poloha pro nasávání; C – poloha pro vypouštění.

Byrety sloužící k regulovanému odběru kapalin při titracích (Obr. 2E) jsou skleněné trubice opatřené dělicími značkami. Před výtokem je umístěn kohoutek nebo pružná tlačka s hadičkou. Některé byrety mají pro lepší odečítání objemu zadní stěnu z bílého skla s modrým pruhem ve středu.

Odměrné baňky (Obr. 2B), stejně jako pyknometry (nádobky pro stanovování hustoty), jsou kalibrovány na dolítí – to znamená, že při jejich naplnění obsahují právě požadovaný objem. Hrdlo odměrných baňek je poměrně úzké, po celém obvodu opatřené ryskou. I zde je třeba plnit tak, aby se spodní okraj menisku dotýkal rysky a při plnění mít oko v úrovni rysky (Obr. 3). Podobně jako odměrné válce i odměrné baňky se vyrábějí v objemech od 5 ml do 2 l. Odměrné baňky se používají k přípravě roztoků o přesné koncentraci. Vlastní směšování složek roztoku provádíme při ne zcela zaplněné baňce a teprve po úplné homogenizaci a vyrovnání teplot (teplota, na kterou je baňka kalibrována, je uváděna na plášti baňky – většinou 20°C) opatrně se doplní rozpouštědlem po rysku.



Obr. 4: Odečítání objemu u odměrné baňky.

Příprava pufrů a měření pH

Pufry neboli tlumivé roztoky jsou roztoky slabých kyselin a jejich solí (konjugovaných zásad) nebo slabých zásad a jejich solí (konjugovaných kyselin), které jsou schopné udržovat stabilní hodnotu pH po přidání kyseliny nebo zásady do systému.

Výběr vhodného pufru se řídí především požadovanou hodnotou pH, iontovou silou, možnými interakcemi s ostatními komponentami reakční směsi apod. Má-li mít pufr dostatečnou **pufrační kapacitu**, je třeba vybrat takovou slabou kyselinu nebo zásadu, jejíž pK_a se neodlišuje od požadované hodnoty pH o více než 1. Pufrační kapacita závisí také na celkové koncentraci (molaritě) pufru. Očekáváte-li například, že pH roztoku v průběhu reakce bude klesat (např. při studiu lipasové reakce, kdy jsou do roztoku uvolňovány ionty H^+ disociací vznikajících mastných kyselin), pak zvolte pufr o vyšší koncentraci a s pK_a pod hodnotou pH, v níž začínáte pokus.

Složení vhodného pufru lze nalézt v laboratorních příručkách. Podle tabulek se smíchají příslušné (obvykle dva) roztoky pro dosažení nominální hodnoty pH. Vždy je nutné skutečnou hodnotu pH měřením ověřit a případně ji upravit roztokem kyseliny nebo zásady. Jednodušší je připravit pufr prostou úpravou pH roztoku zvolené soli, kyseliny nebo báze. Pro jeho požadovanou hodnotu vyberete vhodnou slabou kyselinu nebo zásadu (ev. je v návodu pro práci s daným materiálem určena) a vypočtete navážku tak, abyste získali potřebný objem pufru o zvolené koncentraci. Navážené množství rozpustíte v menším objemu vody (asi 80 % konečného objemu). Pak nastavíte požadované pH roztokem silné (v některých případech i slabé) kyseliny či zásady a nakonec doplníte vodou na vypočtený objem. Pouze při užití pufrů o více složkách (pokrývajících široké rozmezí pH) takto postupovat nelze, musí se namíchat podle tabulky, zkontrolovat a eventuálně upravit pH.

Většina pufrů podléhá mikrobiální kontaminaci, proto je pro některé účely vhodné je konzervovat (azid, toluen, thymol), většinou ale stačí jejich uchování v chladničce bez konzervace. Takto je vhodné skladovat jen menší množství připraveného pufru, které brzy spotřebujete (maximálně do týdne). Připravíte-li si větší množství pufru do zásoby, uchovávejte ho zmrazený v plastové láhvi. Před použitím je nutno rozmrazit celé množství pufru a roztok zamíchat. Po odebrání potřebného objemu je možné zbytek opět zmrazit. V případě potřeby můžete pufr sterilizovat v autoklávu. Při manipulaci s takto ošetřenými roztoky musíme dodržovat sterilní podmínky a pufr zpětně nekontaminovat, např. nesterilní špičkou automatické pipety.

Hodnotu pH roztoku ovlivňuje jeho **ředění**, zejména v extrémních hodnotách stupnice (pod 3 a nad 11), v rozmezí fyziologických hodnot již méně. Proto se raději vyhněte přípravě koncentrovanějších zásobních roztoků, z nichž se pak ředěním připravuje pracovní roztok. pH pufru ovlivňuje také **teplota** změnou pK_a slabé kyseliny nebo báze. **Tabelované hodnoty pH** jsou obvykle vztaženy na 18, 20 nebo 25 °C. V biochemii se často pracuje za chladu, kdy se pH může lišit od hodnoty nastavené při přípravě pufru za laboratorní teploty. Např. měření pH závislosti enzymové reakce by mohlo být více či méně zkresleno, pokud se podstatně liší teplota experimentu od teploty, při které byl pufr připraven. V případě nutnosti lze upravit hodnotu pH za příslušné teploty.

Běžné pufrы užívané v biochemických laboratorních postupech pokrývají **neutrální až mírně alkalickou oblast o pH 6,0 – 9,0**. Některé operace se provádějí v prostředích více kyselých či bazických. Nejběžnější kyseliny a báze užívané k přípravě pufrů v biochemii jsou přehledně uvedeny v tabulce 1. Vedle požadované hodnoty pH se výběr složek řídí také jejich možnými specifickými vlivy na reakční směs. Někdy může dojít k vysrážení některých komponent směsi pufrem (K^+ - chloristanem, soli železa; Ca^{2+} - fosfátem, komplexy borátů se sacharidy apod.), k interakci složek pufru s bílkovinami (Cl^- iont s albuminem), k reakci s analytickými činidly a k inhibici enzymů (v některých případech barbituráty).

Složky pufru v některých případech mohou být využity jako substráty (citrát, acetát) aj. Pro biochemické účely se používají vedle běžných anorganických a organických látek i speciální kyseliny a báze vhodné pro jejich inertnost k dalším složkám reakčních směsí (viz vysvětlivky pod tabulkou 1).

Koncentrace H^+ iontů v roztoku se stanovuje spektrálními či elektrochemickými metodami. První z nich využívají toho, že změna pH vyvolá v některých organických sloučeninách (acidobazických indikátorech) změnu struktury lišící se spektrálními vlastnostmi (absorpce či fluorescence). Ve druhém případě se využívá změny elektrochemického potenciálu vlivem pH.

Nejjednodušší spektrální metody měření pH jsou **vizuální metody**, kdy se sleduje změna zbarvení indikátoru při změně pH. K této změně dochází u jednotlivých indikátorů v určité oblasti pH (nalezneme v chemických laboratorních tabulkách). Pro stanovení hodnoty pH musíme vybrat indikátor, u kterého dochází k barevné změně v přesně definovaném intervalu pH. Jsou vhodné pro indikaci dosažení požadované hodnoty pH, pro indikaci bodu ekvivalence při acidobazických titracích, kontrolu udržování pH apod. Používají se ve formě vodného či ethanolického roztoku (0,04 - 0,10 %), který se přikápně ke sledovanému vzorku. Pro univerzální použití slouží směsi indikátorů pokrývající svými barevnými přechody celou škálu pH nebo její část, která nás zajímá. Užívají se ve formě **papírků napuštěných příslušnou směsí indikátorů**. Souprava je doplněna barevnou stupnicí, se kterou porovnáváme zbarvení papírku po namočení do vzorku a ustálení zbarvení.

Barevný přechod indikátoru můžeme přesněji sledovat **pomocí spektrofotometrických přístrojů**. To umožňuje též kvantifikovat barevný přechod při změně pH (stanovení pK_a). Tento způsob však není běžně užíván, je omezen na speciální případy (např. měření pH uvnitř buněk a organel nebo v nevodných rozpouštědlech). Při použití **fluorescenčních indikátorů** jsme zcela odkázáni na měření pomocí přístrojů – fluorimetrů. Tento způsob nemá vizuální alternativu.

Potenciometricky se pH určuje měřením potenciálu vhodné elektrody. Prakticky se užívá pouze skleněná elektroda, i když se můžete setkat i s elektrodami plastovými. Tělo skleněné elektrody je tvořeno skleněnou trubičkou, responsivním elementem je tenká skleněná membrána obvykle tvaru baničky na spodním konci. Je naplněna standardním vnitřním roztokem ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HCl}$), v němž je ponořena argentchloridová elektroda (Ag drátek pokrytý vrstvičkou AgCl). Pro speciální účely mohou mít elektrody různý tvar, např. ploché k měření pH na povrchu gelu, jehlové, mikroelektrody pro měření v mikrozkuvkách aj.

Tab. 1: Přehled nejčastěji užívaných pufrů v biochemii.

Kyselina	Báze	Rozsah pH
KH_2PO_4	K_2HPO_4	6,0 – 8,0
HCl	Tris ^a	6,8 – 8,6
HCl	Imidazol	6,0 – 8,0
MES ^b	NaOH	5,2 – 7,2
MOPSC ^c	NaOH	5,2 – 7,1
TES ^d	NaOH	6,5 – 8,5
HEPES ^e	NaOH	6,5 – 8,5
HCl	5,5-diethylbarbituran-Na	6,8 – 9,6
Kys boritá	Tetraboritan-Na	7,0 – 9,3
Tricin ^f	NaOH	7,2 – 9,1
HCl	Glycin	1,1 – 3,7
Glycin	NaOH	8,2 – 10,0
Kys. citronová	NaOH, KOH	2,2 – 6,2
NaHCO_3	Na_2CO_3	9,0 – 11,0
Na_2HPO_4	NaOH	11,0 – 12,0

^a Tris(hydroxymetyl)aminomethan

^b kyselina 2-(N-morfolino)etansulfonová

^c kyselina 3-(N-morfolino)propansulfonová

^d kyselina N-Tris(hydroxymetyl)metyl-2-aminoetansulfonová

^e kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-etansulfonová

^f N-Tris(hydroxymetyl)metyl-glycin

Obecné zásady práce při zacházení s elektrodou

- 1) **S elektrodou manipulujte opatrně. Skleněná banička je velmi tenká a křehká. Míchá-li se měřený roztok, dbejte na to, aby byla mimo dosah pohybuujícího se míchadla** (ověřte předem). To bývá aktuální při malých objemech vzorku.
- 2) **Elektroda nesmí vyschnout.** Po použití ji vždy opláchnutou a lehce osušenou vraťte zpět do uchovávacího roztoku (3M KCl, pH=7.0).
- 3) **Před měřením je nutno přístroj s elektrodou kalibrovat podle pokynů výrobce.** Elektrodu vyjměte z uchovávacího roztoku, opláchněte destilovanou vodou, odsajte přebytek vody (filtračním papírem nebo buničitou vatou) a ponořte do standardního pufru o pH nejbližším tomu, který bude mít měřený roztok (obvykle bývá k dispozici sada standardních pufrů o pH 4, 7 a 9). Nejčastěji se v laboratoři používá kombinovaná elektroda, zkontrolujte tedy, zda je boční vývod referenční elektrody zcela ponořen pod hladinu. Nastavte teplotní korekci na teplotu pufru a kalibračním knoflíkem nastavte na stupnici nebo digitálním výstupu hodnotu pH standardního pufru. Elektrodu pak vyjměte a po opláchnutí ji ponořte do měřeného vzorku. Jeho pH nám ukáže výchylka či digitální výstup pH-metru. Kalibraci je nutno provádět vždy po zapnutí přístroje nebo měníme-li pH měřených vzorků o více než 1. Též při dlouhodobých měřeních ji občas zkontrolujte.
- 4) Většina dnešních přístrojů vyžaduje kalibraci na dva pufrы, v tomto případě můžete pracovat v širším rozmezí pH, aniž byste vždy znovu museli přístroj kalibrovat. Zvolte vhodné pufrы ohraničující oblast, ve které hodláte pracovat. Na jeden z nich nastavte výchozí hodnotu. Po ponoření elektrod do druhého pufru nastavte jeho hodnotu a to tak, že zároveň nastavíte směrnici závislosti potenciálu na pH. Ta by měla být $-59 \text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$, její podstatný pokles indikuje malou citlivost elektrody a je třeba zvážit její výměnu, event. úpravu.

Příprava roztoků

Základním pravidlem pro jakoukoli přípravu roztoků, vzorků pro analýzu nebo pro účely preparace nebo čištění sloučenin je, že se rozpouštěná látka přidává do vody a nikdy naopak. Při přípravě odměrných roztoků se kvantitativně přenáší navážka nebo odměřené množství kapaliny do vody, která zaujímá asi $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ objemu baňky. Kvantitativní přenesení znamená, že navážku krystalické látky sklepnete do malé nálevky zasunuté do hrdla odměrné baňky, spláchnete větším množstvím destilované vody ze stříčky, vodou ze stříčky dále do nálevky vydatně opláchnete navažovací lodičku, a nakonec nálevku vypláchnete vodou ze stříčky po celém vnitřním povrchu. Rozpouštění můžete urychlovat pouze mícháním krouživým pohybem celé odměrné baňky, nikdy ne tyčinkou nebo míchadlem. Teprve po úplném rozpuštění navážky a vyrovnání teploty baňky s okolím můžete baňku doplnit po rysku destilovanou vodou (poslední kapky přidávejte pipetou). Pokud je látka, jejíž roztok připravujete, kapalná, funkci navažovací lodičky může převzít malý odměrný válec, který se pak rovněž do odměrné baňky vyplachuje. Pokud kapalnou složku do vody v odměrné baňce pipetujete, jste problémů s kvantitativním přenesením vzorku ušetřeni. Po doplnění odměrné baňky po rysku nezapomeňte obsah důkladně promíchat. Naplněnou baňku uzavřete čistou, suchou, v současné době nejčastěji polyethylenovou zátkou a několikrát obraťte dnem vzhůru a zpět. Zátku přitom stále v hrdle baňky přidržujte palcem.

ÚKOL Č. 1: Určete průměrnou hmotnost a chybu měření váženého předmětu.

Na analytických vahách určete hmotnost deseti stejných předmětů (mikrozkumavka a kyveta), určete aritmetickou průměrnou hmotnost jednoho předmětu a chybu měření.

POMŮCKY:

Kyvety
Mikrozkumavky
Analytické váhy

POSTUP:

1. Analytické váhy zapněte tlačítkem ON:OFF.
2. Otevřete boční dvířka vah, položte vážený předmět na váhy, boční dvířka zavřete. Zvažte 10x mikrozkumavku a 10x kyvetu.
3. Hodnotu si zapište (s přesností na všechna desetinná místa!).
4. Postup opakujte pro všechny vážené předměty.

VYHODNOCENÍ:

Při měření se můžete dopustit nahodilých a systematických chyb. Zatímco systematické chyby mohou být zapříčiněny například nevhodným postupem při měření, špatnou kalibrací apod. a nelze je odstranit opakovaným měřením za stále stejných podmínek, chyby nahodilé můžete výpočtem konečné hodnoty z dostatečně velkého počtu měření z větší části eliminovat. Opakovaným měřením se vliv nahodilých chyb zmenší.

Do tabulky zapíšete všechny vámi naměřené hodnoty a měřenou veličinu (hmotnost) označíte A. Při počtu n měření naměříte postupně hodnoty A_1 až A_n .

Průměr nalezených hodnot \hat{A} vypočítáte dle následujícího vzorce:

$$\hat{A} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i}{n}$$

Čím je n větší, tím více se hodnota \hat{A} blíží správné hodnotě A.

Odchylku každého měření od této střední hodnoty označíte x_i a spočítáte ji dosazením hodnot do vzorce:

$$x_i = A_i - \hat{A}.$$

Střední chybu výsledku (aritmetického průměru) vypočítáte dosazením hodnot do následujícího vzorce:

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n-1}}$$

Výsledek měření zapište ve tvaru $A = \hat{A} \pm \delta$. Nezapomeňte na jednotky!

ÚKOL Č. 2: Práce s automatickou pipetou

Seznamte se se sadou automatických pipet a vyzkoušejte si princip, na kterém fungují.

POMŮCKY:

Automatické pipety s rozsahem 1-5 ml, 200-1000 μ l, 20-200 μ l

Špičky pro automatické pipety

Kádinky o objemu 25 ml

Kádinka o objemu 250 ml

Předvážky s dostatečnou citlivostí, případně analytické váhy.

POSTUP:

1. Připravte tři suché 25 ml kádinky.
2. Předvážky zapněte tlačítkem ON:OFF.
3. Otevřete boční dvířka vah, položte prázdnou kádinku č. 1 na váhu, boční dvířka zavřete.
4. Zapište si hmotnost kádinky (všechny desetinná místa!).
5. Kádinku odstraňte z vah a pipetujte do ní pipetou s rozsahem 1-5 ml desetkrát 1 ml destilované vody.
6. Kádinku s vodou zvažte, hmotnost kádinky s vodou si zapište (všechna desetinná místa!).
7. Stejně postupujte s kádinkou č. 2, do které pipetujte desetkrát 200 μ l a zároveň desetkrát 400 μ l destilované vody pipetou s rozsahem 100-1000 μ l.
8. Stejně postupujte s kádinkou č. 3, do které pipetujte desetkrát 100 μ l a zároveň desetkrát 20 μ l destilované vody pipetou s rozsahem 20-200 μ l.

VYHODNOCENÍ:

Uvědomte si, jakou hustotu má destilovaná voda, a vypočítejte, jaké hmotnosti by měly mít kádinky s vodou. Pokud jste nedosáhli požadované hmotnosti, zopakujte pipetování znovu po konzultaci s vedoucím cvičení.

Získané hodnoty zapište do tabulky, stanovte hmotnost vámi pipetovaných objemů, vypočítejte teoretickou hmotnost všech vámi pipetovaných objemů, stanovte procentuální odchylku měření.

ÚKOL Č. 3: Ředění zásobního roztoku manganistanu draselného.

POMŮCKY:

Skleněné pipety dělené s balónkem
Skleněné zkumavky
Stojan na zkumavky
Kádinky 150 ml – 2 ks

CHEMIKÁLIE:

80% roztok manganistanu draselného

POSTUP:

1. Vypočítejte objem 80% roztoku manganistanu draselného a destilované vody, které musíte smíchat, abyste dostali 10 ml 60%, 40%, 30%, 20% a 10% roztoku manganistanu draselného. Hodnoty запиšte do tabulky 2. Výsledky konzultujte s vedoucím cvičení!

Tab. 2: Ředění manganistanu draselného

Finální koncentrace KMnO_4	60%	40%	30%	20%	10%
80% KMnO_4 [ml]					
Destilovaná voda [ml]					

2. Do pěti skleněných zkumavek pipetujte vámi vypočítaná množství 80% roztoku manganistanu draselného a vody. K pipetování použijte skleněnou pipetu s balónkem.

ÚKOL Č. 4: Příprava 200 ml 0,1 mol·l⁻¹ Tris/acetátového pufru o pH 8.0

POMŮCKY:

Elektromagnetická míchačka	Špachtle/lžička
Magnetické míchadlo	Odměrná baňka (200 ml)
Kádinky (250 ml)	Pasteurova pipeta
Předvážky	Nálevka
Váženka	pH metr

CHEMIKÁLIE:

Tris báze (Tris(hydroxymetyl)aminomethan, $M_r = 121,14$)

Koncentrovaná kyselina octová

POSTUP:

1. Vypočítejte hmotnost Tris báze potřebné na přípravu 200 ml pufru o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹.
2. Odvažte toto množství na navažovací lodičce na předvážkách.
3. Do 250 ml kádinky nalijte přibližně 150 ml destilované vody, následně do kádinky nasypete naváženou Tris bázi z navažovací lodičky, zbytky Tris báze ulpělé na váženec spláchněte stříčkou s destilovanou vodou do vody v kádince, vodu v kádince doplňte přibližně na 180 ml.
4. Do kádinky vložte elektromagnetické míchadlo a na elektromagnetické míchačce míchejte roztok až do jeho úplné homogenizace (elektromagnetickou míchačku zapnete na pravé straně přístroje spínačem On/Off, pozor z druhé strany míchačky se většinou zapíná zahřívání roztoku!!!).
5. Zapněte pH metr, vyjměte elektrodu z obalu s uchovávacím roztokem, elektrodu opláchněte destilovanou vodou, zlehka opatrně osušte papírovým ubrouskem a ponořte do roztoku Tris báze **tak, aby elektroda byla plně ponořena, ale zároveň nebyla ve styku s magnetickým míchadlem, které by ji mohlo poškodit!!!**
6. Čekejte, než se vám ustálí hodnota pH.
7. Upravte hodnotu pH na hodnotu 8.0 pomocí koncentrované kyseliny octové. Přidávky kyseliny provádějte pomocí Pasteurovy pipety za stálého míchání roztoku. Pokud změna pH po přidání jedné kapky je příliš velká, naředte si kyselinu octovou – úprava pH se tak zjemní.
8. Až se hodnota pH stabilizuje (asi jednu minutu je konstantní) vyjměte elektrodu, řádně ji opláchněte, zlehka opatrně osušte papírovým ubrouskem a vraťte ji do roztoku KCl.
9. Pufr z kádinky přelijte kvantitativně pomocí nálevky do 200 ml odměrné baňky a opatrně doplňte objem po rysku stříčkou s destilovanou vodou.
10. Hotový pufr přelijte do zásobní láhve.

ÚKOL Č. 5: Příprava 100 ml 0,2 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7,0

Některé pufrů lze připravit smícháním dvou roztoků – bazické a kyselé složky pufru. Takto lze připravit i K-fosfátový pufr o přesně dané koncentraci a pH. Poměr bazické a kyselé složky pro přípravu K-fosfátového pufru udává Tabulka 3.

Tab. 3: Příprava 100 ml 0,2M K-fosfátového pufru.

pH při 25 °C	V (0,2M K ₂ HPO ₄) [ml]	V (0,2M KH ₂ HPO ₄) [ml]
6,0	12,3	87,7
6,5	31,5	68,5
7,0	61,0	39,0
7,5	84,0	16,0
8,0	94,7	5,3

POMŮCKY:

Elektromagnetická míchačka
Magnetické míchadlo
Kádinky (150 ml)
Předvážky
Váženky

Špachtle/lžičky
Odměrné baňky (100 ml)
Pasteurova pipeta
Odměrné válce (50 ml, 100 ml)
pH metr

CHEMIKÁLIE:

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄, M_r = 136,09, kyselý fosforečnan)
Hydrogenfosforečnan draselný (K₂HPO₄, M_r = 174,18, bazický fosforečnan)
Kyselina fosforečná (H₃PO₄)
Hydroxid draselný (KOH)

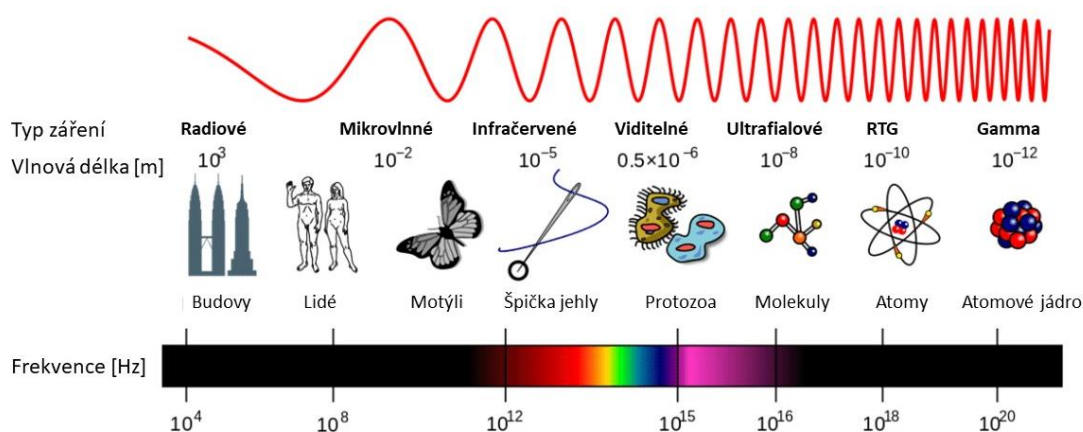
POSTUP:

1. Vypočítejte hmotnost kyselého fosforečnanu potřebnou na přípravu 100 ml 0,2 M roztoku.
2. Odvažte toto množství na navažovací lodičce na předvážkách, kvantitativně přeneste do 250 ml kádinky. Fosforečnan rozpustíte v přibližně 150 ml destilované vody.
3. Po úplné homogenizaci přelijte roztok do odměrné baňky a doplňte objem po rysku stříčkou s destilovanou vodou.
4. Analogicky postupujte při přípravě 100 ml 0,2 M roztoku bazického fosforečnanu.
5. V 250 ml kádince smíchejte vypočtené objemy obou fosforečnanů tak, abyste získali 200 ml 0,2M K-fosfátového pufru o pH=7,0.
6. Hodnotu pH pufru zkontrolujte pomocí pH-metru (postup měření viz předchozí úkol).
7. Případnou odchylku od pH=7,0 upravte kyselinou fosforečnou nebo hydroxidem draselným.
8. Připravený pufr přelijte do zásobní láhve.

2. Spektrofotometrická měření

Spektrofotometrie v biochemii

Viditelné záření tvoří malý úsek z oblasti elektromagnetického vlnění v rozmezí délek 400-700 nm. Přilehlá oblast rozmezí vlnových délek 200-400 nm se nazývá blízká ultrafialová oblast, 700-2000 nm se pak nazývá blízká infračervená oblast. Celá oblast vlnových délek se také nazývá oblastí elektronových spekter.



Obr. 1: Spektrum elektromagnetického záření. Rozdělení spektra elektromagnetického záření, velikost pozorovatelného objektu v dané oblasti.

Prakticky v každé biologicky zaměřené laboratoři se dnes setkáte s přístroji pro měření spektrálních veličin ve viditelné a ultrafialové oblasti, tzv. spektrofotometry, pro registraci spekter v oblasti od 200 (někdy 185 nm) do 700 nebo 1000 nm. Není divu, vždyť téměř všechny biologicky zajímavé látky (kromě sacharidů) mají v této oblasti, kterou označujeme zkratkou UV-VIS (ultraviolet-visible), charakteristické absorpční pásy a jejich koncentraci lze proto většinou poměrně snadno stanovit na základě jejich spektrálních vlastností.

Určování koncentrace roztoků není jedinou možností využití absorpční spektrofotometrie. Již po několik desetiletí je známo, že absorpční vlastnosti závisí na interakci příslušného chromoforu s okolím. Z toho vyplývá, že vlnová délka absorpčního maxima i intenzita absorpce mohou být ovlivněny řadou procesů, které biochemika enormně zajímají; zde pro ilustraci několik příkladů:

- Při denaturaci biopolymeru (bílkoviny nebo nukleové kyseliny) se mění jeho absorpční spektrum, protože chromofory se dostávají do jiného mikroprostředí (u bílkovin zevnitř globule do vodného prostředí, v DNA z jádra helixu, kde těsně interagují se sousedy vodíkovými a patrovými interakcemi).
- Protože fenolátový ion má jiné vlastnosti než nedisociovaný fenol, je možné ze změny spekter bílkoviny při zvyšování pH roztoku určit titrační křivku tyrosinových zbytků a z ní pak usoudit na jejich lokalizaci v molekule proteinu.
- Při nekovalentní vazbě různých ligandů na biopolymer se často mění jejich spektrum; to dovoluje touto metodou určit počet navázaných ligandů a asociační konstantu.

Odvození Lambert-Beerova zákona

Interakcí záření s hmotou, tj. s atomy a molekulami, dochází k jeho absorpci, tj. k přijetí kvanta energie a zvýšení energie atomu (molekuly) z původního základního stavu do stavu excitovaného. Při absorpci záření v oblasti 200-2000 nm dochází převážně k excitaci elektronového systému, resp. valenčních elektronů, zúčastněných atomů a molekul. Vlastní interakce záření s hmotou se sleduje na absorpčním spektru, tj. na záznamu závislosti množství absorbovaného záření na jeho vlnové délce.

Na spektrofotometrickou kyvetu s optickou drahou l , která obsahuje absorbující látku, dopadá světlo o intenzitě I_0 . Pokles intenzity světla dI v důsledku jeho absorpce vrstvou roztoku o tloušťce dl , pak bude:

$$-dI = k \cdot l \cdot dl,$$

kde k je konstanta úměrnosti. Po separaci proměnných a integraci (interval $0-l$) získáme vztah zvaný **Lambertův zákon**, kde I je intenzita světla, vystupujícího z kyvety:

$$\log \frac{I_0}{I} = k \cdot l.$$

Analogicky můžeme postupovat při studiu závislosti poklesu intenzity světla na koncentraci absorbující látky při konstantní délce kyvety. Zde vycházíme z předpokladu, že dI bude přes jinou konstantu j úměrné vzrůstu koncentrace dc , tedy:

$$-dI = j \cdot l \cdot dc.$$

Opět integrujeme, tentokrát v intervalu 0 až c , a získáme **Beerův zákon**:

$$\log \frac{I_0}{I} = j \cdot c.$$

Veličina I_0 je intenzita světla, které do kyvety vstupuje, a I je intenzita světla vystupujícího. Nabízí se vyjádřit poměr těchto hodnot jako frakci světla pohlčeného v kyvetě; tato veličina se pak nazývá transmittance T :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

a často se vyjadřuje v procentech. Z fyzikálního pohledu není přirozenějšího popisu absorpčních efektů než pomocí této veličiny. Ta však byla v posledních letech téměř opuštěna, neboť pro praktické laboratorní používání trpí zásadním nedostatkem: není přímo úměrná koncentraci absorbující látky. Přímou úměru zajišťuje veličina na levé straně obou výše uvedených vztahů, která se nazývá absorbance A :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T}.$$

Dříve se místo „absorbance“ užívalo termínu „extinkce“ (označení E); v anglosaské, zejména americké literatuře toto označení tvrdošijně přežívá. Evropský čtenář by si měl být jist, že pojmy absorbance a extinkce (a podobně i absorpční a extinkční koeficient) jsou naprosto ekvivalentní.

Poněkud jinak je třeba nahlížet na pojem **optická hustota**, zkracovaný O.D. nebo OD (optical density). Prochází-li paprsek kyvetou, může být jeho intenzita snižována i jinými jevy než absorpcí (pohlčením fotonu spojeným s excitací molekuly do vyššího energetického stavu). Pro zeslabení intenzity v důsledku absorpce je vhodný termín absorbance, zde také platí (většinou, jak je uváděno dále) Beerův zákon. Pokud je však intenzita paprsku zeslabována například rozptylem záření na velikých částicích

(agregátech molekul při turbidimetrických měřeních, buňkách při proměřování růstových křivek v mikrobiologii apod.), je vhodné toto zeslabení kvantifikovat jako optickou hustotu. Ta je definována stejně jako absorbance, ale nemá přímou souvislost s jevem absorpce:

$$OD = \log \frac{I_0}{I}$$

Jinými slovy, optická hustota je pojmem nadřazeným, kdy jenom v některých případech je totožná s absorbancí.

Spojíme-li oba výše uvedené zákony, získáme jeden z neznámějších fyzikálně-chemických vztahů, zvaný **Lambertův-Beerův zákon**:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l,$$

kde ε (epsilon) je konstanta úměrnosti, odvoditelná z výše definovaných konstant k aj. Jinými slovy je to absorbance roztoku o jednotkové koncentraci absorbující látky v kyvetě o jednotkové délce. Vzhledem k tomu, že, jak vyplývá z definiční rovnice, je absorbance bezrozměrná veličina, musí mít ε rozměr (délka⁻¹ · koncentrace⁻¹). Za jednotkovou délku zde prakticky vždy považujeme 1 cm; podle toho, v jakých jednotkách dosazujeme koncentrace, nabývá pak ε různých rozměrů.

Pokud je koncentrace vyjádřena v jednotkách mol·l⁻¹, má ε rozměr cm⁻¹·l·mol⁻¹, v tom případě se jedná o molární absorpční (postaru ještě někdy též extinkční) koeficient. Jeho rozměr lze dále upravit vykrácením délkových jednotek, čímž se získá tvar cm²·mmol⁻¹; je dobré si uvědomit, že tento rozměr je zcela totožný s výše uvedeným základním tvarem a mmol nemá nic do činění s milimolární koncentrací. Jiným, zcela ekvivalentním rozměrem, je M⁻¹·cm⁻¹, kde M označuje molaritu; tento dokonale pochopitelný tvar je užíván zejména v anglosaské literatuře.

Až doposud byla uvažována přítomnost jediné absorbující látky ve zkoumaném roztoku, tento stav je však u reálných vzorků spíše výjimečný. Většinou je přítomno několik látek, které absorbují při dané vlnové délce. Měřená absorbance je pak součtem všech dílčích absorbancí.

Určování koncentrace roztoků pomocí absorpční spektrofotometrie

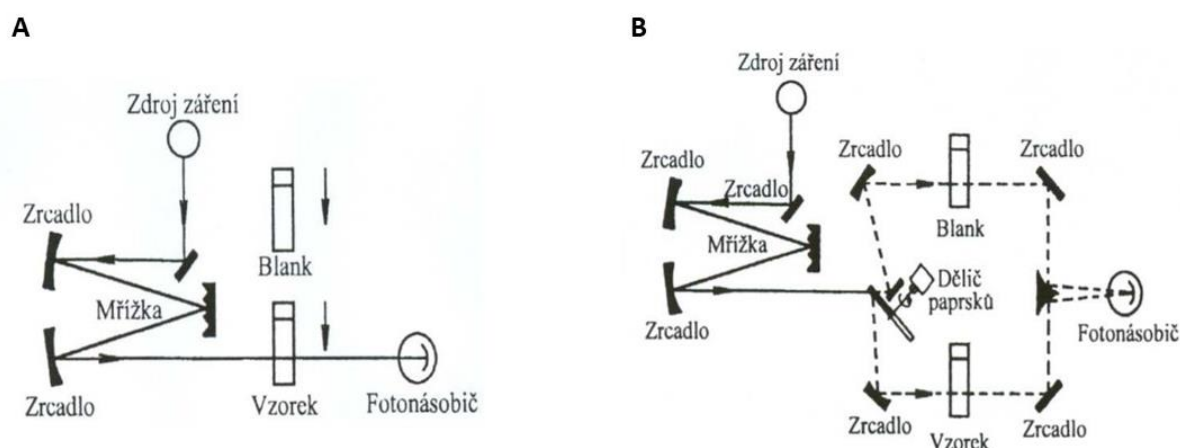
Jak je patrné z definice absorbance, při jejím měření je třeba znát intenzity (nebo lépe světelné toky) dvou paprsků: tzv. referenčního (srovnávacího – I_0), jenž nebyl oslaben absorpcí, a měrného (I), který prošel kyvetou se vzorkem. Podle způsobu měření se spektrofotometry dělí na jednopaprskové a dvoupaprskové, případně spektrofotometry na principu diod-array-detectors.

Jednopaprskové přístroje mají jedinou optickou dráhu (viz Obr. 2A). Paprsku se nejdříve postaví do cesty referenční vzorek (v laboratorní mluvě zvaný blank) a množství světla, jež jím prošlo, je zaregistrováno jako I_0 ; poté je do optické dráhy umístěn měřený vzorek, zaregistruje se I a z obou údajů je vypočtena absorbance. Na starších a jednodušších přístrojích tohoto typu se nastavují dva parametry: při zacloněném paprsku se kompenzuje tzv. temný tok, který detekční zařízení poskytuje i v situaci, kdy na něj žádné světlo nedopadá (označení „0“ souvisí s nulovou transmitancí při zacloněném paprsku), poté se do paprsku umístí referenční vzorek, jehož absorbance je z definice nulová (100% transmittance). Toto nastavení je nutno provádět pro každou vlnovou délku, a proto se přístroje tohoto typu nepoužívají pro měření spekter. U moderních přístrojů se závislost I_0 na vlnové

délce pro referenční vzorek uloží do paměti a po změření této závislosti pro vzorek (I) se vypočtou hodnoty absorpance pro všechny vlnové délky.

Dvoupaprskové přístroje mají odděleny dráhy pro referenční paprsek a pro měřený vzorek (viz Obr. 2B). V každém okamžiku proto mohou registrovat I i I_0 a vypočítat absorpaci. Tyto přístroje, obvykle poněkud dražší, dovolují velmi snadno měřit různé typy diferenčních spekter a mívají i lepší optické parametry (monochromaticnost světla).

Spektrofotometry na principu diod-array-detectors (DAD). Tato koncepce se objevila v polovině 80. let minulého století. Ostatní spektrofotometry mají monochromátor umístěn před kyvetovým prostorem, takže vzorkem prochází pouze vybrané („monochromatické“) světlo, které je pak přímo zpracováno detektorem. V DAD přístrojích prochází všechno světlo (polychromatické) vzorkem a teprve poté je rozloženo mřížkou; řada světlocitlivých diod pak analyzuje množství světla jednotlivých vlnových délek, které prošlo vzorkem, respektive referenčním roztokem. Toto experimentální uspořádání má sice poněkud nižší kvalitu optických parametrů (rozlišovací schopnost z hlediska spektrální čistoty), jeho předností je však rychlost měření, neboť intenzita světla všech vlnových délek se snímá v jediném okamžiku. Proto je toto uspořádání vhodné zejména pro kinetická měření nebo jako detektory chromatografických zařízení (HPLC).



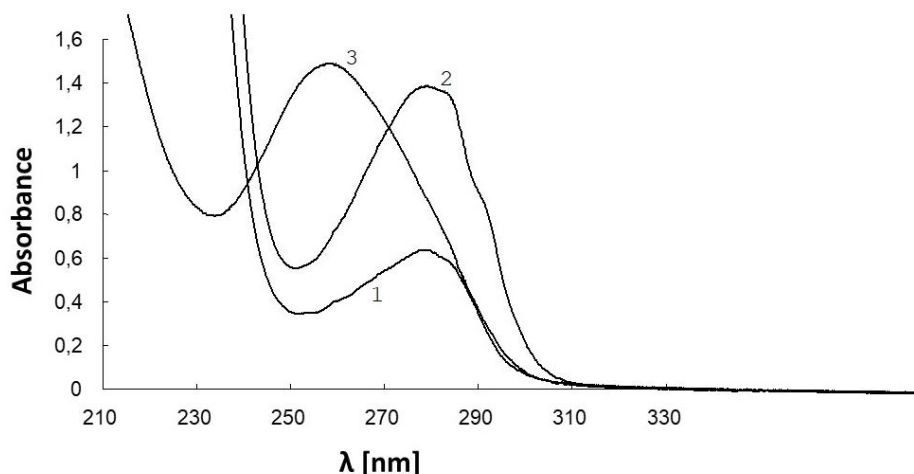
Obr. 2: Schémata spektrofotometrů. A – jednoprskový spektrofotometr; B – dvoupaprskový spektrofotometr.

Při stanovování koncentrace skupiny látek bývá problémem zvolit vhodný „obecný“ standard. Typickým příkladem je zde **stanovování koncentrace proteinů**. Aromatické postranní řetězce bílkovin absorbují v UV oblasti v okolí 280 nm. Často se volí jako standard **hovězí sérový albumin (BSA, z angl. bovine serum albumin)**, jehož absorbance jednoroztokového činí 6,8; zastoupení aromatických aminokyselin v albuminu je však ve srovnání s většinou bílkovin relativně nízké a hodnota jeho specifického absorpčního koeficientu je v „rodině“ rozpustných bílkovin nepoužitelná. Na Obr. 3 je srovnání spekter albuminu a imunoglobulinu při stejné koncentraci.

V biologickém materiálu často komplikuje spektrofotometrické měření **zákal**, který nekontrolovaně zvyšuje **turbiditu roztoku**, jenž se pak přičítá ke skutečné absorpaci. Právě zde by bylo vhodnější

mluvit o optické hustotě, jejíž vztah ke koncentraci bývá mnohem komplikovanější než přímá úměrnost Beerova zákona. Dobrým vodítkem pro posouzení, zda turbidita významně ovlivňuje změřenou absorbanci při dané vlnové délce, je tvar absorpčního spektra: křivka by měla poměrně rychle klesat k nule, zatímco v zakalených vzorcích klesá mnohem pomaleji. Pokud je tímto způsobem zjištěn zákal (pro bílkoviny není u 330 nm OD nulová), je nutno pokusit se vliv zákalu na měřenou absorbanci nějakým způsobem snížit. Např. pro bílkoviny se odčítá registrovaná „absorbance“ u 330 nm od měřené absorbance v maximu u 280 nm.

Jak bylo ukázáno, absorbance při určité vlnové délce je součtem absorbancí všech přítomných absorbujících látek. Při studiu roztoků biologicky aktivních látek se málokdy objevuje situace, že by v inkriminované oblasti spektra (zejména v UV) absorbovala jediná složka roztoku. V tom případě je nutné velmi opatrně posoudit, zda další absorbující látky neovlivňují stanovení. Proto bývá velmi vhodné nespokojovat se s měřením absorbance při jediné vlnové délce, ale proměřit vždy relevantní závislost absorbance na vlnové délce (absorpční spektrum) a podle jeho tvaru usoudit, zda nějaká cizí látka stanovení neruší. Typickým problémem tohoto typu je **překryv spektra bílkoviny příměsí nukleových kyselin**, které mají, díky vysokému obsahu aromátů velmi vysoký specifický absorpční koeficient (Obr. 3).



Obr. 3: Absorpční spektra.

1 – hovězí sérový albumin ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$); 2 – lidský imunoglobulin G ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$); 3 – DNA ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$); optická délka kyvety 1 cm.

Kalibrační funkce

Kalibrací se rozumí vztah mezi dvěma veličinami x a y , kde veličinou y bývá měřený signál (absorbance A , potenciál E , napětí článku U , proud I , elektrický odpor R ,...), a veličina x představuje stav nebo vlastnost měřeného systému (koncentrace c , obsah m , objem V , teplota t ,...).

Vztah těchto dvou veličin $y=f(x)$ je definován matematickým modelem, tzv. kalibrační funkcí. Jak vidno veličina x je v tomto vztahu nezávislou proměnnou, veličina y proměnnou závislou (tzn., že její hodnoty jsou závislé na hodnotách veličiny x).

Každá závislost dvou nebo více proměnných může v obecném pohledu vykazovat dvojí formu:

1) funkční závislost

- určité hodnotě nezávisle proměnné x odpovídá vždy jediná, určitá hodnota závisle proměnné y , jinak řečeno – po dosazení x do kalibrační funkce získáme pouze jednu hodnotu y .

2) statistická závislost

- pro určitou hodnotu nezávisle proměnné x existuje vždy určité pravděpodobnostní rozdělení závisle proměnné y (náhodné veličiny). Toto rozdělení je charakterizováno především aritmetickým průměrem hodnot y a rozptylem. Se změnou hodnoty x se hodnoty y zákonitě mění a mění se i aritmetický průměr. Funkční závislost proměnných veličin řeší regresní analýza. Posouzení těsnosti rozložení závisle proměnné y kolem regresně vypočítané funkce $y = f(x)$ umožňuje korelace.
- Zjednodušeně řečeno – při dosazení jedné hodnoty x do kalibrační funkce můžeme očekávat pouze určité hodnoty y .

Výpočet kalibrační funkce se provádí pomocí regresní analýzy, což je statistická metoda porovnání metod. Pro jednoduchost se v kalibraci se dává přednost lineárním závislostem.

Kalibrační funkce a stanovení koncentrace pomocí spektroskopie

Jak již bylo zmíněno, kalibrační funkce je vynesení závislosti absorbance (závislá proměnná, osa y) na koncentraci absorbující látky (nezávislá proměnná, osa x). Je možné volit kteroukoli vlnovou délku, až na výjimky však volba padá na vlnovou délku absorpčního maxima stanovované látky, a to ze dvou důvodů:

- 1) je zde nejvyšší citlivost stanovení
- 2) přesnost stanovení zde nejméně závisí na přesnosti nastavení vlnové délky.

Kalibrační funkci získáme z proměření absorbancí kalibračních roztoků (standardů) o známých koncentracích a jejich vynesení proti dané koncentraci standardu.

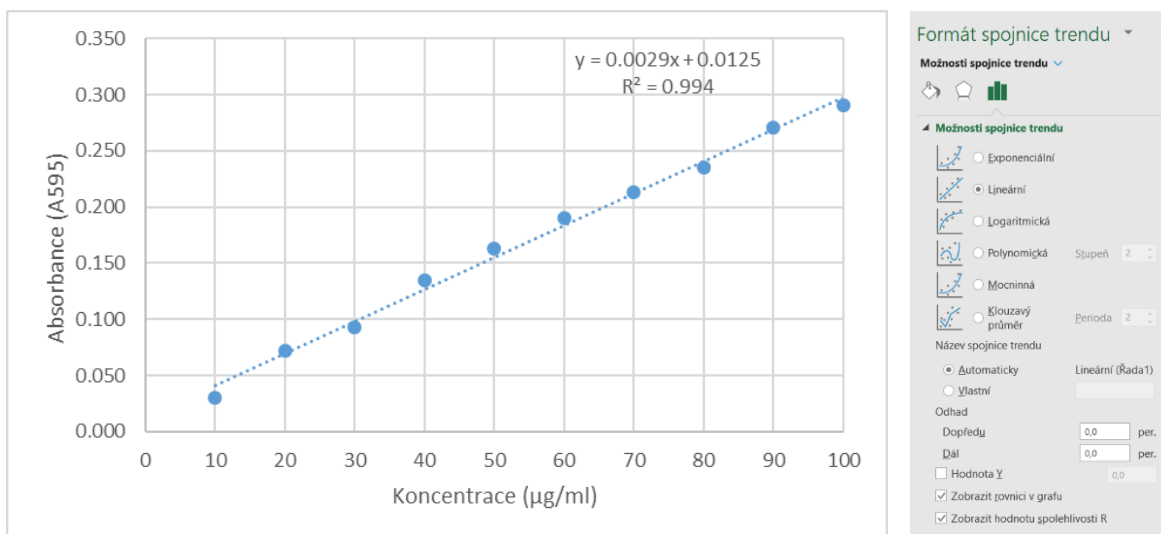
V tomto případě je kalibrační funkce popsána obecnou rovnicí lineární funkce:

$$y = a \cdot x + b,$$

- příčemž:
- y...hodnota měřeného signálu (zde absorbance)
 - a...sklon přímky (směrnice)
 - x...koncentrace (uvedená na ose x)
 - b...průsečík funkce s osou y

U lineárních kalibračních funkcí je koeficient b významnou veličinou – její nenulová hodnota svědčí o konstantní soustavné chybě; pokud je chyba kladná, lze ji eliminovat odečtením slepého pokusu (blanku), takže analytický signál by měl být nulový při $x = 0$.

Díky znalosti kalibrační rovnice lze z naměřených hodnot absorbancí zpětně dopočítat koncentrace vzorků.



Obr. 4: Příklad kalibrační závislosti zjištěné po proměření roztoků kalibračních standardů BSA o známých koncentracích.

Korelační koeficient R

Korelační koeficient R určuje těsnost rozložení závisle proměnné veličiny kolem lineární regresní přímky. Čím je hodnota korelačního koeficientu blíží ± 1 , tím je závislost mezi proměnnými těsnější a tím více se blíží přímce.

Korelační koeficient tedy nabývá hodnot $\langle -1; 1 \rangle$. Kladných hodnot nabývá pro přímou závislost, záporných pro nepřímou závislost, nulové hodnoty značí lineární nezávislost. Pozor, nulová hodnota korelačního koeficientu neznámá, že jsou na sobě proměnné nezávislé absolutně, pouze tuto závislost nelze vyjádřit lineárním vztahem. Určení hodnoty koeficientu má praktický smysl až při větším počtu dvojic x_i, y_i .

Koeficient determinace R^2

Koeficient determinace R^2 udává míru kvality zvoleného regresního modelu. Jeho hodnota se pohybuje v rozmezí $\langle 0; 1 \rangle$, přičemž čím více se jeho hodnota blíží k 1, tím kvalitnější regresní model je zvolen.

Možné problémy

Při pokusech o stanovení koncentrace pomocí měření absorbance se mohou vyskytnout různá úskalí. V dalším textu budou probrány nejběžnější příčiny, jež vedou k chybám při těchto stanoveních. Závislost absorbance na koncentraci by měla být přímková a procházet počátkem; pak je směrnice této přímky rovna absorpčnímu koeficientu. Často se však objevují odchylky od této nejjednodušší závislosti:

1) Přímka neprochází počátkem.

Taková situace je vždy artefaktem: při nulové koncentraci látky musí být absorbance nulová. Dosti obvyklou chybou je to, že při počítačovém vyhodnocení je zvolen nevhodný přímkový model, povolující nenulový úsek na ose y . Pokud přímku „nelze přinutit“, aby procházela počátkem, bývá chyba v nevhodné volbě referenčního roztoku, znečistěné referenční kvyetě apod.

2) Závislost není přímková.

K tomuto jevu dochází v případě, kdy se látka vyskytuje v několika spektrálně odlišitelných stavech, přičemž koncentrace jednotlivých složek roztoku závisí na celkové koncentraci. Jako typický příklad se uvádějí oligomerní rovnováhy, kdy oligomer má jiné absorpční spektrum než monomerní jednotky. V těchto případech, kdy neplatí Beerův zákon, nelze snadno určit koncentraci z měření při jediné vlnové délce.

3) Pokud látka fluoreskuje, je část absorbovaného světla opět vyzařena; toto světlo při vyšších hodnotách absorbance zdánlivě snižuje její hodnotu. Závislost absorbance na koncentraci je pak zakřivená a limitně se blíží k nějaké hodnotě.

Důležitá pravidla při stanovení koncentrace analytu ve vzorku pomocí kalibrační funkce

Rozsah kalibrace, koncentrace analytu

Koncentrace analytu by měla spadat do rozsahu kalibrace (pracovního rozsahu měření), což je interval koncentrací, v němž lze dosáhnout požadované hodnoty přesnosti a pravdivosti měření. Jinak řečeno, koncentrace stanovované látky by měla spadat do rozsahu koncentrací standardů použitých pro sestavení kalibrační funkce. Pokud je koncentrace mimo rozsah koncentrací standardů, jsou dvě možnosti nápravy:

- 1) Pokud je koncentrace analytu ve vzorku vyšší než koncentrace standardů, je třeba vzorek vhodně zředit.
- 2) Pokud je koncentrace analytu ve vzorku nižší než rozsah koncentrací standardů, je třeba vzorek vhodným způsobem zahustit nebo upravit koncentrace kalibračních roztoků a proměřit celou kalibrační křivku znovu.

Technické replikáty

Pro snížení chyb během stanovení koncentrace analytu ve vzorku je vhodné měření provést se stejným vzorkem ve více opakováních – hovoříme o technických replikátech (duplikáty, triplikáty, ...). Opakovaným měřením se eliminují chyby způsobené například nepřesným pipetováním reakcí.

Ředění

Pro stanovení koncentrace analytu ve vzorku je třeba brát v potaz skutečnost, zda a jak byl vzorek před stanovením zředěn. Pokud by došlo k opomenutí tohoto faktu, byla by stanovena nižší koncentrace analytu, což by mohlo mít za následek neúspěch během dalších analýz vzorku.

ÚKOL Č. 1: Spektrofotometrické stanovení koncentrace roztoku síranu nikelnatého

POMŮCKY:

Odměrné baňky (5 ml) se zátkami

Kádinky

Pipety, špičky

Pasteurova pipeta

Spektrofotometr Lightwave II

Kyveta

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

0,5 mol·l⁻¹ síran nikelnatý

Neznámý vzorek

POSTUP:

1. Vypočítejte objem zásobního roztoku síranu nikelnatého o koncentraci 0,5 mol·l⁻¹ a objem destilované vody, které musíte smíchat, abyste získali 5 ml roztoků o koncentracích 0,025 mol·l⁻¹; 0,05 mol·l⁻¹; 0,1 mol·l⁻¹; 0,2 mol·l⁻¹ a 0,3 mol·l⁻¹. Hodnoty запиšte do tabulky a konzultujte s vedoucím cvičení.

Tab. č. 1: Ředění zásobního roztoku síranu nikelnatého.

Finální koncentrace NiSO ₄ [mol·l ⁻¹]	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3
0,5 mol·l ⁻¹ NiSO ₄ [ml]					
Destilovaná voda [ml]					

2. Do odměrných baněk o objemu 5 ml pipetujte vypočtené množství zásobního roztoku. Roztoky v baňkách doplňte po značku destilovanou vodou (použijte Pasteurovu pipetu), uzavřete a dobře promíchejte.
3. Zapněte spektrofotometr. Vyberte možnost Applications (1), dále zvolte možnost Wavescan (3). Nastavte rozsah vlnových délek od 600 do 800 nm a potvrďte zeleným tlačítkem OK. Do kyvetového prostoru umístěte kyvetu s čistou vodou (blank), kyvetu plňte přibližně do ¾ objemu.
4. Před tím, než kyvetu vložíte do spektrofotometru, je nutné se ujistit, že kyveta je zvenku suchá, případně ji osušit papírovým ubrouskem.
5. Zmáčkněte modré tlačítko pro vynulování přístroje.
6. Blank z kyvety vylijte a nahradte 0,3 mol·l⁻¹ roztokem síranu nikelnatého. Pro měření stiskněte zelené tlačítko.
7. V zobrazeném spektru pomocí šipek najděte absorpční maximum.

Sestrojení kalibrační křivky:

1. Na spektrofotometru vyberte možnost Applications (1), dále možnost Single Wavelength (1) a nastavte získanou vlnovou délku, při které měl síran nikelnatý nejvyšší absorbanci.

2. Přístroj vynulujte na destilovanou vodu a proměřte sadu připravených roztoků nikelnatých iontů, každý vzorek změřte ve třech opakováních. Tyto hodnoty budou sloužit k sestrojení kalibrační křivky. Během měření je třeba kyvetu mezi jednotlivými vzorky propláchnout destilovanou vodou.
3. Na závěr změřte absorbanci neznámého roztoku, taktéž ve třech opakováních.

VYHODNOCENÍ:

1. U každé koncentrace síranu nikelnatého vypočítejte průměrnou hodnotu ze tří naměřených absorbancí.
2. Získanou závislost absorbance na koncentraci vynesete do grafu (MS Excel). Graf musí být správně pojmenován, označte osy vč. jednotek a do grafu vložte spojnicí trendu – lineární regresi. Z rovnice kalibrační křivky odečtete koncentraci síranu nikelnatého v neznámém vzorku.

ÚKOL Č. 2: Praktická aplikace spektrofotometrie v biochemické laboratoři, stanovení obsahu proteinů Bradfordovou metodou s vazbou barviva Coomassie blue

Stanovení celkové koncentrace proteinů v roztoku je jednou z nejčastějších analýz v biochemické laboratoři. Bradfordova metoda stanovení celkových proteinů je založena na tvorbě komplexu mezi proteiny a triarylmetanovým barvivem **Coomassie Brilliant blue G250**, které se na proteinové molekuly váže dvěma způsoby. Trifenylnmethanová skupina se váže na nepolární části proteinu a anion sulfoskupiny na bazické skupiny ve vedlejších řetězcích aminokyselin (arginin a lysin). Po vazbě barviva na proteiny dochází k barevné změně, která je úměrná množství proteinu. Reakce je velmi citlivá u albuminu a řady globulárních proteinů. Metoda je díky své jednoduchosti a citlivosti široce používána. Jako kalibrační protein se používá **hovězí sérový albumin (BSA)**. Barevný produkt barviva s proteinem vykazuje absorpční maximum při **595 nm** (absorpční maximum samotného barviva je 465 nm). Stanovení obsahu celkových proteinů Bradfordovou metodou je však rušeno řadou interferujících látek, které jsou známy (detergenty např. dodecylsírán sodný, Triton X-100; soli), které se do vzorku dostávají během precipitace a purifikace a které narušují tvorbu komplexu barviva s proteiny.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Váženka	Kádinky
Špachtle/lžička	Pipety, špičky
Analytické váhy	Spektrofotometr Lightwave II
Odměrná baňka (100 ml)	Kyvety
Mikrozkumavky	Vortex
Zkumavky skleněné	

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Bradfordovo činidlo
 Hovězí sérový albumin (BSA)
 Neznámý vzorek

POSTUP:

1. Příprava roztoků

- 1) Od vyučujícího si vyžádejte neznámý vzorek (vzorek BSA o neznámé koncentraci) pro stanovení koncentrace proteinů. Vzorek nechejte rozmraznout volně na stole. Před měřením vzorek promíchejte na vortexu.
- 2) Připravte si 100 ml zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (zkracovaného jako BSA) o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Navážku albuminu je potřeba spočítat a výsledek konzultovat s vedoucím cvičení. Zásobní roztok BSA naředte přesně do 100 ml odměrné baňky!
- 3) Po jeho správném naředění část roztoku přelijte z odměrné baňky do kádinky, z níž budete roztok odebírat při další práci.
- 4) Standardy: připravte si mikrozkušavky, které si očísľujete, viz tabulka níže. Do těchto zkumavek budete pipetovat standard BSA v příslušných koncentracích. V každé mikrozkušavce se standardem je finální objem 1 ml. Standardy promíchejte na vortexu.
- 5) Připravte si blank. Blankem neboli slepým vzorkem se rozumí takový vzorek, který obsahuje veškerá činidla kromě vzorku nebo standardu. Místo nich se používá voda, resp. rozpouštědlo použité pro rozpuštění standardů. Dále je zpracováván jako vzorky nebo kalibrační standardy!

Tab. 2: Koncentrace standardů BSA pro kalibrační řadu v rozmezí koncentrací 0 – 100 $\mu\text{g/ml}$ a postup přípravy daných koncentrací ze zásobního roztoku BSA o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$.

Číslo zkumavky	Koncentrace BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Příprava standardů (doplní student)		Celkový objem (μl)
		Objem vody (μl)	Objem zásobního roztoku BSA (μl)	
1	10			1000
2	20			1000
3	30			1000
4	40			1000
5	50			1000
6	60			1000
7	70			1000
8	80			1000
9	90			1000
10	100			1000

2. Stanovení proteinů ve zkumavkovém uspořádání na stolním spektrofotometru

- 1) Připravte si sadu skleněných zkumavek pro kalibraci (počet dle počtu kalibračních roztoků), které očísľujete stejně jako kalibrační roztoky, tj. 0 (blank), 1, 2, 3...
- 2) Připravte si skleněné zkumavky pro neznámé vzorky, které vhodně pojmenujete. Každý vzorek budete měřit ve dvou opakováních (tzv. duplikátech).
- 3) **Příprava blanku:** do zkumavky napipetujte 500 μl vody (objem je totožný jako pro vzorek nebo standard) + 500 μl vody.

- 4) **Příprava standardů:** do očíslovaných zkumavek napipetujte 500 μ l standardu naředěného na příslušnou koncentraci + 500 μ l vody.
- 5) **Příprava vzorku:** do vhodně pojmenované zkumavky napipetujte 500 μ l neznámého připraveného vzorku + 500 μ l vody.
- 6) Do všech připravených zkumavek napipetujte 2000 μ l pracovního roztoku Bradfordova činidla.
- 7) Po napipetování všech komponent reakce do příslušných zkumavek, zkumavky promíchejte na vortexu a nechte je 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Měřte do 1 hodiny od ukončení inkubace.

3. Měření na stolním spektrofotometru

- 1) Na spektrofotometru vyberte možnost Applications (1), dále možnost Single Wavelength (1) a nastavte vlnovou délku 595 nm.
- 2) Přístroj vynulujte na blank a proměřte sadu připravených roztoků standardů BSA. Tyto hodnoty budou sloužit k sestrojení kalibrační křivky.
- 3) Na závěr změřte absorbanci neznámého vzorku.
- 4) **DŮLEŽITÉ:** Plastové měřicí kyvety je nutno po každém měření proplachovat roztokem 50% etanolu a poté destilovanou vodou. Barva Coomassie Brilliant Blue se váže na stěny kyvety, takže při nevymytí kyvety by docházelo k velkému zkreslení měření. **Při měření postupujte od nejnižší koncentrace k nejvyšší.**

VYHODNOCENÍ:

1. Z naměřených hodnot absorbancí standardů BSA vypočtete průměrnou hodnotu pro danou koncentraci standardu.
2. Získanou závislost absorbance na koncentraci vynesete do grafu (MS Excel). Graf musí být správně pojmenován, označte osy vč. jednotek a do grafu vložte spojnicí trendu – lineární regresi. Z rovnice kalibrační křivky stanovte obsah proteinů v neznámém vzorku.

3. Gelová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografické metody

Současnou práci v biochemickém výzkumu a ve studiu přírodních látek si nelze bez chromatografických metod představit. Jejich principem je **rozdělování látek mezi stacionární a mobilní fází na základě rozdílných afinit složek k uvedeným fázím**. Mobilní fáze je buď kapalina nebo plyn, stacionární fáze může mít velmi různorodou formu např. částičky tuhé fáze, tenká vrstva kapaliny na pevných částicích, film kapaliny na vnitřní straně kapiláry atd. Objevení chromatografie je připisováno ruskému botanikovi M. S. Cvětovi (1872-1919), který rozdělil chloroplastové pigmenty z rostlinných extraktů na sloupci uhličitanu vápenatého.

Chromatografické metody se mohou dělit podle různých kritérií, nejčastější dělení je podle podstaty procesu zodpovědného za separaci, podle skupenství mobilní fáze, způsobu provedení (sloupcová, tenkovrstevná, papírová atd.) či podmínek (nízkotlaká, střednětlaká nebo vysokotlaká kapalinová chromatografie). Podle podstaty procesu lze chromatografie rozdělit do následujících kategorií, je však třeba mít na paměti, že zejména při dělení biopolymerů (bílkovin, nukleových kyselin) se jedná často o kombinaci dvou nebo více separačních principů. Například při rozdělovací chromatografii může docházet také k adsorpci proteinu na povrch sorbentu nebo se uplatňuje síťový efekt porézních sorbentů (gelová permeační chromatografie).

Adsorpční chromatografie

Patří k nejstarším a nejrozšířenějším metodám. **Pevný adsorbent** je obtékán vhodným rozpouštědlem, které unáší analyzovanou směs látek. Na povrchu adsorbentu dochází k různě silné adsorpci těchto látek a tím k jejich rozdělení. Nejčastěji užívanými adsorbenty jsou látky pórovité struktury, jako jsou silikagel, Al_2O_3 , CaCO_3 , hydroxylapatit či aktivní uhlí. Při adsorpci na polárních sorbentech hrají největší úlohu interakce typu **ion – dipól** a **dipól – dipól**, zatímco u nepolárních sorbentů to jsou převážně **van der Waalovy síly**. Adsorpční chromatografie může být v provedení **sloupcovém (CC – column chromatography)** nebo **tenkovrstevném (TLC – thin layer chromatography)**.

Zvláštním případem adsorpční chromatografie je hydrofobní chromatografie biopolymerů (zejména proteinů), která využívá jejich schopnosti adsorbovat se na hydrofobní skupiny a povrchy. Vytěsnění adsorbovaných biopolymerů se provádí nejčastěji snížením iontové síly, popř. přidávkem organického rozpouštědla. Jako adsorpční hydrofobní materiály se nejčastěji používají polysacharidové či polyglykolmethakrylátové matrice s navázanými alkylovými řetězci (Sephrosa, Spheron).

Rozdělovací chromatografie

Principem je dělení látek mezi dvě navzájem nemísitelná nebo omezeně mísitelná rozpouštědla a je charakterizováno **rozdělovací konstantou K**, která je rozdílná pro jednotlivé složky směsi a liší se pochopitelně i pro různé systémy rozpouštědel. Volbou složení těchto systémů lze ovlivnit účinnost rozdělení složek směsi. Rozdělovací chromatografie je uspořádána tak, že jedna z kapalných fází je zakotvena na inertoní pevný nosič (silikagel, filtrační papír, křemelina, škrob) a stává se tak fází stacionární, zatímco druhá fáze – mobilní – přes tuto přetéká. Látky ze separované směsi se rozpouštějí mezi obě fáze. Na pevný nosič se zakotvuje především vodná stacionární fáze, která má k nosiči vyšší

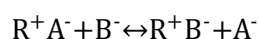
afinitu a jako mobilní je pak používána směs organických rozpouštědel. Častou formou rozdělovací chromatografie je **papírová chromatografie** (PC – paper chromatography) Vývoj nových sorbentů a automatizace pak daly vzniknout novému a v současnosti jednomu z nejpoužívanějších typů chromatografie – **vysokoučinné kapalinové chromatografie** (HPLC – high performance liquid chromatography). Při HPLC se pracuje za vysokého tlaku, nazývá se také často jako vysokotlaká kapalinová chromatografie, a proto umožňuje několikanásobně rychlejší a citlivější analýzy všech typů látek oproti klasickým sloupcovým metodám.

Afinitní chromatografie

Je založena na **biochemických interakcích**, jako jsou interakce **enzym – substrát** či **protilátka – antigen**, které probíhají s vysokou selektivitou. Princip je založen na tom, že příslušný substrát či antigen se chemickou reakcí naváže na určitý sorbent, kterým se pak naplní kolona. Enzym nebo protilátka jsou selektivně vychytávány z analyzované směsi a následně mohou být z kolony vymyty. Afinitní chromatografie se kupříkladu využívá k čištění protilátek z krevního séra.

Chromatografie na iontoměničích

Chromatografie na měničích iontů neboli **ionexová chromatografie** je určena pro separaci látek nesoucích náboj. Při výměně iontů se ionty, které jsou elektrostaticky vázány k pevnému a chemicky inertnímu podkladu reversibilně vyměňují za ionty z roztoku:



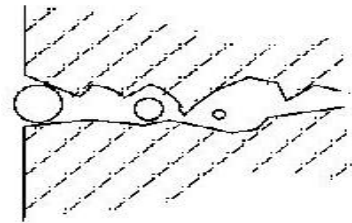
R^+A^- je měnič iontů s navázaným aniontem A^- (**anex**) a B^- odpovídá aniontům v roztoku. Měnič kationtů (**katex**) obsahuje záporně nabitě skupiny, které reversibilně vážou kationty. Afinita iontů k ionexu není stejná, ale závisí na velikosti náboje a na poloměru hydratovaného iontu, a tento fakt je základem separace látek ionexovou chromatografií. Rozdíly v nábojových vlastnostech, jichž ionexová chromatografie využívá, jsou u biologických látek značné, proto tímto způsobem lze oddělit i látky jinak velmi podobných vlastností. Při vazbě iontu na ionex je však třeba počítat i s dalšími vlivy a to zejména s van der Waalsovými a polárními interakcemi. Síla vazby je také ovlivněna iontovou silou a hodnotou pH prostředí. Dále je třeba si uvědomit, že látky nesoucí stejný náboj jako ionex nebudou zachyceny vůbec.

Jako chromatografický materiál slouží pro ionexovou chromatografii různé inertní matrice, které mají na svém povrchu kovalentně navázané kladně nebo záporně nabitě funkční skupiny (anexy – aminoethyl, diaminoethyl; katexy – karboxymethyl). Charakter funkčních skupin pak udává **sílu ionexu**, jejich celkové množství a využitelnost určuje **kapacitu ionexu**. Označení **slabé, střední a silné ionexy** vyjadřuje stupeň disociace skupin v závislosti na pH. Zatímco silné ionexy jsou úplně disociovány v širokém rozmezí pH, disociace slabých ionexů je naopak na pH silně závislá. Slabé katexy ztrácejí náboj při pH pod 6, slabé anexy při pH nad 9. Jako matrice se v ionexové chromatografii používají tři druhy materiálů: syntetické pryskyřice jako je např. nejčastěji používaný polystyren zesíťovaný divinylbenzenem, celulóza a konečně gely na bázi polyakrylamidu, dextranů nebo agarosy. Hlavní fáze ionexové chromatografie jsou ekvilibrace ionexu, navázání látek ze vzorku a vymytí nenavázaných složek, změna podmínek, která vede k selektivní desorpci a konečně regenerace ionexu.

Gelová chromatografie

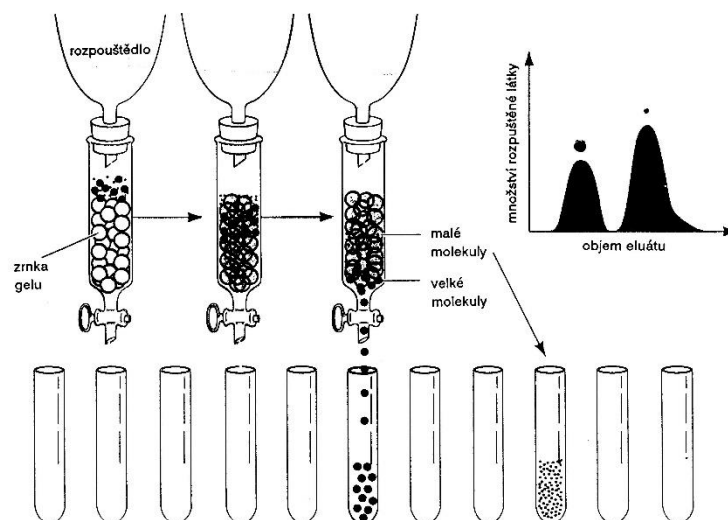
Tento typ chromatografie je jednou z nejpoužívanějších metod v preparativní chemii biopolymerů. Na rozdělávání látek při gelové chromatografii mají rozhodující vliv rozměry jejich molekul. Na pórovitém gelu (také nazývaném **molekulové síto**) dochází k zadržování malých molekul, tím že pronikají do nitra částic gelu (Obr. 1), kdežto molekuly, které jsou tak velké, že neprojdou póry, se nezadržují a vymývají se z kolony rychleji. Malé molekuly jsou tedy zpomalovány více než velké a jednotlivé složky směsi se uvolňují ze sloupce v pořadí klesající velikosti molekuly (relativní molekulové hmotnosti, viz Obr. 1, Obr. 2). Kritériem rozdělení látek je **velikost pórů** v částicích gelu. Gel by neměl obsahovat žádné specificky ani nespecificky adsorbující skupiny, aby nedocházelo k dělení látek jiným mechanismem. Jde v podstatě o typ rozdělovací chromatografie v systému kapalina – kapalina, kde stacionární fáze je kapalina zakotvená v gelu. Stejná kapalina pak tvoří mobilní fázi, která protéká mezi částicemi gelu.

V literatuře je možné se setkat s různými názvy pro gelovou chromatografii. Pro oddělování látek s velmi rozdílnými molekulovými hmotnostmi např. při odsolování bílkovin se používá hlavně termín **gelová filtrace**. Proces separace látek s blízkými molekulovými hmotnostmi je pak nazýván jako **gelová permeační chromatografie** (GPC – gel permeation chromatography). Často bývá používán také termín **kapalinová vylučovací chromatografie**, který je z teoretického hlediska asi nejvhodnější.



Obr. 1: Zadržování částic v pórech gelu.

Jednotlivé typy gelů lze charakterizovat tzv. **frakcionačním rozsahem gelu**, což je rozmezí molekulových hmotností nebo velikostí molekul, v němž jejich změna způsobuje změnu v elučním objemu (objem mobilní fáze, který proteče kolonou od nanesení vzorku až po dobu, kdy je daná látka z kolony vymývána). Nejčastěji používaným typem gelu jsou Sephadexy.

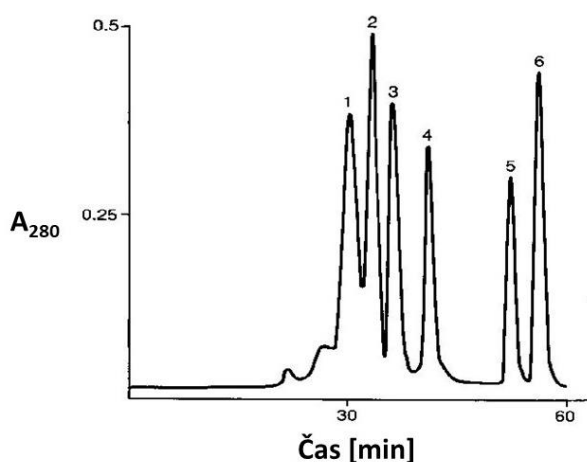


Obr. 2: Princip gelové chromatografie.

Sephadexy jsou vyráběny z fragmentů dextranu, což je polysacharid s relativní molekulovou hmotností okolo 107 – 108, který vzniká ze sacharosy působením bakterie *Leuconostoc mesenterium*. Dextranová vlákna se pak zesítují příčnými vazbami působením epichlorhydrinu. Stupeň zesítování a s tím související velikost póru lze pak ovlivnit vzájemným poměrem epichlorhydrinu a dextranu. Jednotlivé typy Sephadexů se označují číslicí a písmenem. Na odsolování se nejčastěji používají Sephadexy s nižším číslem. Pro dělení látek o vyšších molekulových hmotnostech pak Sephadexy G-75, G-150 nebo jiné značky gelů jako je Sepharosa, Sephacryl, Bio-gel.

Gelová permeační chromatografie se velmi často užívá pro stanovování relativní molekulové hmotnosti makromolekul. Před vlastní chromatografií daného vzorku je nutno provést separaci standardů o známé relativní molekulové hmotnosti a z jejich elučních objemů sestavit závislost. Většinou je vynášena závislost retenčního času na logaritmu molekulové hmotnosti. Z retenčního času vzorku o neznámé hmotnosti, který je separován za stejných podmínek jako směs standardů, se pak jednoduše odečte jeho relativní molekulová hmotnost. Podmínkou je, aby vzorek nebyl znečištěn látkami o přibližně stejné molekulové hmotnosti, které zkreslují retenční čas vzorku. Důležité je také vhodné zvolení typu gelu tak, aby se do jeho frakcionačního rozsahu vešly všechny standardy a samozřejmě i vzorek. Na Obr. 3 je znázorněn eluční profil směsi standardů na koloně Superosy 12 HR používané v systému FPLC (fast protein liquid chromatography).

Odsolování roztoků biopolymerů pomocí gelové chromatografie (**gelová filtrace**) bývá často vhodnější než dialýza, a to především z časových důvodů. Odsolováním nestabilních biopolymerů dialýzou dochází často k jejich denaturaci, právě z důvodu časové náročnosti procesu. Používá se nejčastěji Sephadex G-25, pro odsolování biopolymerů s relativní molekulovou hmotností nad 30 000 je pak vhodnější Sephadex G-50. Důležitá je také délka kolony, při větších objemech nanášeného vzorku je pak nutno úměrně zvyšovat délku náplně v koloně tak, aby se během průtoku směs nízké a vysokomolekulárních látek stačila od sebe oddělit. Obecně se udává, že při gelové chromatografii by měl činit objem nanášeného vzorku maximálně 1-2% z celkového objemu kolony. Pro gelovou chromatografii se proto používají kolony 75 cm dlouhé a často i delší.



Obr. 3: Typický chromatogram směsi proteinů na koloně Superosy 12 HR.

1 – protilátka IgG ($M_r = 160000$); 2 – hovězí sérový albumin ($M_r = 67000$); 3 - β -laktoglobulin ($M_r = 37000$); 4 – cytochrom c ($M_r = 12400$); 5 – vitamín B12 ($M_r = 1355$); 6 – cytidin ($M_r = 246$).

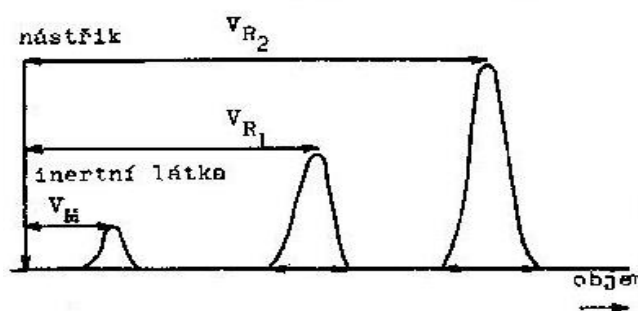
Chromatografie na koloně

Při **sloupcové chromatografii** (chromatografie na koloně) je chromatografický materiál umístěn do chromatografické kolony (skleněná nebo kovová trubice) a vytvoří tak sloupec, na němž probíhá dělení. Po aplikaci vzorku na kolonu dochází vlivem toku mobilní fáze k pohybu jednotlivých složek kolonou a k jejich separaci. Náplň kolony je různá podle toho, o jaký typ chromatografie se jedná. Kolony je možné naplnit v laboratoři nebo lze zakoupit kolony již naplněné, které jsou dodávány řadou firem. To platí zejména o kolonách pro chromatografické techniky, kdy dělení probíhá za zvýšeného tlaku (HPLC) na sorbentech s velmi malým průměrem částic (několik mikronů) a správné naplnění kolony je jedním z rozhodujících faktorů pro kvalitu separace látek. Hlavní podmínkou je, aby kolona byla naplněna **kontinuálně** a náplň byla v celé své délce **kompaktní bez jakýchkoliv heterogenit**. Moderní zařízení pro kapalinovou sloupcovou chromatografii se skládá z rezervoárů mobilních fází, dávkovače vzorku, kolony s chromatografickým materiálem, čerpadel (popř. gradientového mixeru), detektoru měřícího eluát – vytékající mobilní fázi (spektrofotometr, refraktometr, hmotnostní spektrometr), jímače frakcí a výstupu analyzovaných dat (zapisovač, počítač).

Charakteristickou veličinou pro každou separovanou látku je **eluční objem** nebo **eluční čas**, označovaný V_R resp. t_R . Eluční objem představuje celkový proteklý objem mobilní fáze od nanesení rozdělované látky na kolonu po dosažení maximální koncentrace této látky v eluátu. Eluční čas je pak analogicky doba od nástřiku po maximum eluční křivky dané látky. Eluční objem V_R může být ještě dále charakterizován jako součet V_R' tj. skutečný eluční objem a V_M **mrtvý objem kolony**.

$$V_R = V_R' + V_M$$

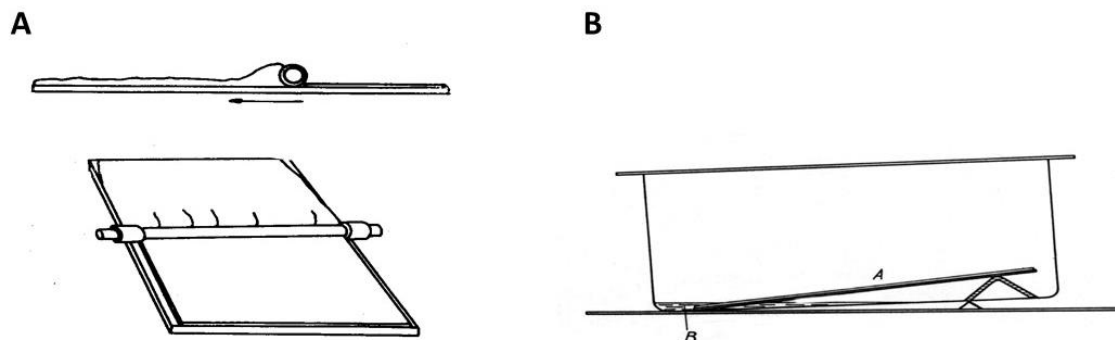
Mrtvý objem kolony se dá charakterizovat jako celkový objem, který v koloně zaujímá mobilní fáze. Experimentálně se dá určit tak, že se na kolonu aplikuje inertní látka, která není na koloně zadržována žádnými silami a její eluční objem se pak rovná mrtvému elučnímu objemu (Obr. 4).



Obr. 4: Eluční profil při sloupcové kapalinové chromatografii. V_M – mrtvý eluční objem, V_{R1} a V_{R2} eluční objemy látek 1 a 2.

Chromatografie na tenké vrstvě

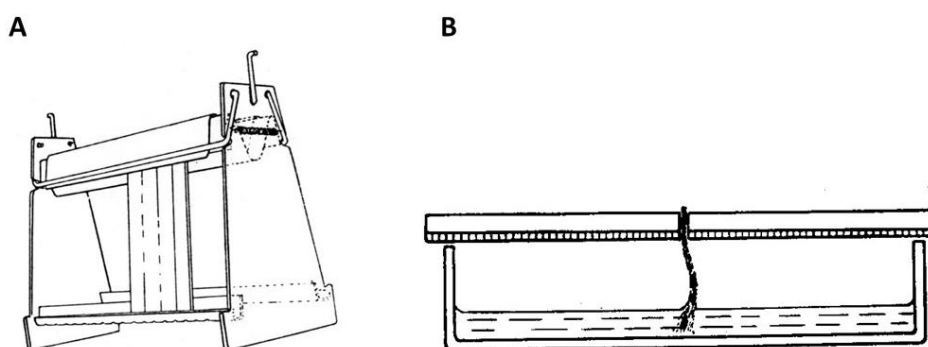
Chromatografie na tenké vrstvě (**TLC**, thin layer chromatography) se nejčastěji provádí u adsorpční, případně u rozdělovací a ionexové chromatografie. TLC se používá především pro analýzu zkoumané směsi, v menší míře pak pro preparativní účely. Hlavní využití má TLC při separaci nepolárních látek. Pro TLC se používají **sypané vrstvy** (např. oxid hlinitý, celulóza), které jsou však kvůli mechanické stabilitě méně vhodné než **vrstvy lité**. Vrstva adsorbentu je nanášena na podložku ve stejnoměrné vrstvičce pomocí skleněné tyčinky s gumovými zarážkami (viz Obr. 5A)



Obr. 5: Chromatografie na tenké vrstvě. A – Příprava sypané tenké vrstvy. B – Vyvíjení sypané vrstvy v horizontální poloze: A - deska s vrstvou, B - rozpouštědlo.

Lité vrstvy se připravují ze suspenze stacionární fáze (např. silikagel) a pojidla (např. sádra). Nejpoužívanější jsou komerčně dostupné lité vrstvy Al_2O_3 na hliníkové fólii známé pod názvy Silufol nebo Alufol. Cenově dražší jsou vrstvy, kdy je jako nosič použito sklo a na něj upevněn silikagel nebo celulóza. S oblibou se používají i polymerní nosiče s vrstvou polyamidu.

Vlastní provedení TLC může probíhat v několika uspořádáních. Klasické je **šikmé uspořádání**, kdy je deska s tenkou vrstvou umístěna do vyvíjecí nádoby (chromatografická komůrka) asi pod úhlem 20 stupňů a na dno nádoby je nalito rozpouštědlo (Obr. 5B). Důležité je, aby chromatografická komůrka byla uzavřena a atmosféra uvnitř se mohla nasýtit párami rozpouštědla. Pokud je deska umístěna v komůrce vertikálně, jedná se o chromatografii **vzestupnou** nebo **sestupnou**, v závislosti na tom, zda je rozpouštědlo umístěno dole nebo nahoře. Vzestupná chromatografie se provádí ve speciálních komůrkách, ve kterých lze vyvíjet i více chromatogramů najednou. Při sestupné chromatografii se jako nosič většinou používá speciální chromatografický papír (komerčně dodávaný pod značkou Whatman), který se zavěsí do nádoby s rozpouštědlem (viz Obr. 6A).



Obr. 6: Vyvíjecí zařízení pro vyvíjení. A – Zařízení pro sestupnou papírovou chromatografii. B – Kruhové vyvíjení papírové chromatografie.

Je třeba připomenout, že papírová chromatografie je založená na principu rozdělovací chromatografie na rozdíl od výše uváděných chromatografií na tenkých vrstvách, které především fungují na principu adsorpční chromatografie. Papírová chromatografie ve vertikálním uspořádání se pak provádí většinou jako **kruhová**. Doprospěřed papíru se umístí knot, kterým vzlíná rozpouštědlo, a kolem něj jsou nanášeny vzorky, které pak migrují k okraji papíru (Obr. 6B).

Velkou předností chromatografie na tenkých vrstvách je velká časová úspora, malá spotřeba látek i rozpouštědel, minimální experimentální zařízení a snadné provedení. Jelikož při TLC a papírové chromatografii nelze přímo zjistit charakteristickou veličinu udávající mobilitu dané látky – eluční objem, či retenční čas jako u sloupcové chromatografie, používá se pro charakterizaci a identifikaci látek jiná veličina, tzv. **retenční faktor R_f** . Retenční faktor udává poměr vzdálenosti středu skvrny látky od startu (V_M) k vzdálenosti čela mobilní fáze (V_R) tj. vzdálenost kam až doputuje mobilní fáze.

$$R_f = \frac{V_M}{V_R}$$

Při separaci směsi látek je pak vždy žádoucí provádět i chromatografii **standardů** v tomtéž pokusu. Identifikace je pak snadnější. Pro kvantitativní vyhodnocení je zapotřebí provést proměření jednotlivých skvrn pomocí denzitometru nebo vyškrabání či eluci jednotlivých skvrn a změření koncentrace látek v eluátech.

Detekce látek při tenkovrstevné a papírové chromatografii se provádí různými způsoby:

- přímá – skvrny barevných látek jsou dobře vidět pouhým okem (rostlinná barviva);
- absorpce světla v UV oblasti – používá se adsorbentu obsahující fluoreskující složku, po osvětlení UV světlem deska fluoreskuje, akorát v místech rozdělených látek jsou vidět tmavá místa;
- fluorescence – některé látky po ozáření UV světlem samy svítí např. některé alkaloidy;
- specifické barvení – chromatogram se obvykle vyvíjí postříkáním nějakým specifickým činidlem, které se separovanou látkou tvoří barevné produkty (např. ninhydrin je specifické činidlo na aminokyseliny se kterými dává fialově-červené produkty);
- izotopové techniky – látky jsou označeny radioaktivními izotopy a při vyhodnocování se měří unikající radioaktivita.

ÚKOL Č. 1: Gelová chromatografie proteinu s nízkomolekulární látkou

V této úloze budou od sebe pomocí gelové filtrace odděleny hemoglobin a síran nikelnatý. Průběh gelové filtrace lze dobře sledovat díky barevnosti obou látek, nikelnaté ionty jsou zelené, krevní barvivo hemoglobin má červeno-hnědou barvu. Hemoglobin je sloučenina proteinu – globinu a prosthetické skupiny – hemu, na který je vázáno dvojmocné železo. Molekula hemoglobinu je tetramer, to znamená, že se k sobě vážou čtyři základní jednotky globinu s hemem. Celková molekulová hmotnost tohoto tetrameru ($C_{2932}H_{4724}N_{828}O_{840}S_8Fe_4$) je přibližně 65000 Da.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

30 cm dlouhá kolona na chromatografii	Mikrozkumavky (1,5 ml, 5 ml)
Stojan a svorky na kolonu	Pipeta, špičky
Erlenmayerova baňka (1000 ml)	Kyveta plastová úzká
Peristaltická pumpa	Stolní mikrocentrifuga
Odměrný válec (50 ml)	Spektrofotometr Lightwave II
Kádinky	Konduktometr

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Nabobtnalý Sephadex G-25
Hemoglobin
Síran nikelnatý

POSTUP:

A. Příprava vzorku

1. V mikrozkumavce smíchejte 0,5 ml roztoku hemoglobinu a 0,5 ml roztoku síranu nikelnatého.
2. Do druhé mikrozkumavky napipetujte 1 ml destilované vody – pro vyvážení centrifugy. Centrifugujte na stolní mikrocentrifuze po dobu 5 min. Supernatant přepipetujte do čisté mikrozkumavky.

B. Gelová chromatografie

1. Skleněná kolona o délce 30 cm naplněná Sephadexem G-25 se nachází v těsné blízkosti pracovního stolu – pracujte velmi opatrně, aby nedošlo k jejímu rozbití!

POZOR: Nikdy nenechejte kolonu vyschnout!!! Dbejte na to, aby nad sloupcem gelu v koloně bylo vždy alespoň minimální množství vody.

2. Na horní polici pracovního místa je umístěna Erlenmayerova baňka naplněná destilovanou vodou, která je přes peristaltickou pumpu spojena pomocí gumové hadičky se špuntem s horním ústím kolony.

Během chromatografie hlídejte zásobník s vodou, aby v něm bylo vždy dostatek vody, vyhnete se tím nechtěnému vyschnutí kolony!

3. Pod kolonu umístěte kádinku, do které bude voda odkapávat. Povolte kohout, kterým je uzavřen průtok vody v koloně, zapněte peristaltickou pumpu. Kolonu nechejte 20 min promývat vodou.
4. Když je kolona dostatečně promytá vodou, zavřete kohout kolony, vypněte peristaltickou pumpu.
5. Pak opatrně kohoutem odpusťte vodu ze sloupce gelu tak, aby se klesající hladina vody zastavila těsně nad začátkem sloupce gelu. Kohout opatrně zavřete.
6. Napipetujte opatrně 950 μl vzorku na sloupec gelu a nechejte vsáknout. Pipetujte po obvodu stěny kolony.
7. Pod kolonu umístěte 100ml odměrný válec. Povolte opatrně kohout.
8. Po vsáknutí vzorku na sloupec kohout opatrně uzavřete, naneste 2x 1 ml vody, opatrně povolte kohout a nechejte vsáknout. Totéž ještě jednou s vodou zopakujte. Naneste znovu 2x 1 ml vody a teprve poté na kolonu opět zapojte hadičku ze zásobníku, povolte kohout a spusťte peristaltickou pumpu – dle pokynů vedoucího cvičení.
9. Sledujte dělicí se látky na koloně jako dva barevné pruhy.
10. Dle pokynů vedoucího cvičení začněte jímat frakce do předem připravených kalibrovaných mikrozkušavek frakce po 1 ml.
11. Pokud i po odebrání 30 frakcí stále vytéká z kolony barevný roztok, jímejte do dalších zkumavek až do okamžiku, kdy už eluát není na první pohled zbarven.
12. Po ukončení chromatografie nechte kolonu ještě 20 minut promývat vodou.
13. Najímané frakce analyzujte.

C. Spektrofotometrické stanovení hemoglobinu

Absorbance jednotlivých frakcí budete stanovovat pomocí spektrofotometru Lighwave II při vlnové délce 410 nm, což je vlnová délka maximální absorbance hemové skupiny hemoglobinu.

Do spektrofotometru vkládejte pouze očištěné a osušené kyvety.

1. Zapněte spektrofotometr Lightwave II.
2. Zvolte možnost Application (1) a následně možnost Single Wavelength (1).
3. Nastavte vlnovou délku 410 nm. Potvrďte zeleným tlačítkem.
4. Nejprve je potřeba spektrofotometr vynulovat na blank, kterým je v tomto případě voda. Do kyvety nalijte opatrně ze stříčky destilovanou vodu. Vložte ji do spektrofotometru (směr vložení kyvety do kyvetového prostoru konzultujte s vedoucím cvičení). Stisknutím modrého tlačítka přístroj vynulujete. Vodu z kyvety vylijte.
5. Proměřte absorbance všech frakcí. Po změření vzorky nevytlívejte do odpadu, ale přelévejte je zpět do mikrozkušavek, budou použity v dalším stanovení. Mezi jednotlivými vzorky kyvetu proplachujte destilovanou vodou ze stříčky.

D. Konduktometrické stanovení nikelnaté soli

Obsah nízkomolekulární látky – nikelnaté soli budete detekovat díky faktu, že přítomnost jakýchkoliv iontů zvyšuje vodivost roztoku. Pomocí konduktometru proměřte vodivost všech frakcí dle následujícího postupu:

1. Do konduktometrické cely přelijte měřený vzorek a doplňte destilovanou vodou po rysku 20 ml.

- Do cely ponořte čidlo konduktometru a na displeji odečtěte hodnotu vodivosti v $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Mezi jednotlivými měřeními vždy opláchněte čidlo konduktometru destilovanou vodou!

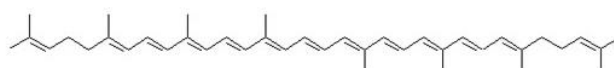
VYHODNOCENÍ:

- Sestrojte chromatogram závislosti elučního objemu na absorbanci při 410 nm a vodivosti. Vyznačte maxima jednotlivých složek, složky označte.
- Na koloně naplněné Sephadexem typu G-200 dělíme směs cytochromu c, riboflavinu a pepsinu. Která látka bude z kolony vytékat jako první, druhá a třetí?

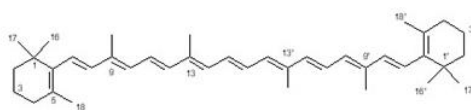
ÚKOL Č. 2: Chromatografie karotenoidů z papriky na tenké vrstvě

Rostliny obsahují mnoho různých látek schopných absorbovat záření ve viditelné oblasti spektra elektromagnetické sluneční radiace. Souborně se tyto látky označují jako barviva či pigmenty, protože působí zbarvení rostlin. Chemicky i funkčně jsou barviva velmi různorodá. Jejich společným a charakteristickým rysem je větší počet konjugovaných dvojných vazeb v molekule. Chemicky tyto látky patří nejčastěji do skupiny cyklických nebo lineárních tetrapyrrolů, karotenoidů a flavonoidů.

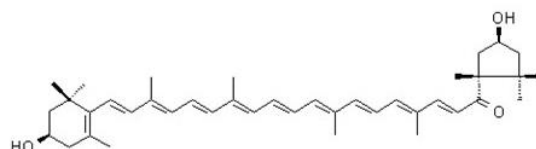
Karotenoidy (Obr. 7) jsou rostlinná barviva rozpustná v tucích v přírodě hojně zastoupená ve všech rostlinných druzích, obvykle zbarvena žlutě, oranžově a červeně. Některé typy karotenoidů lze nalézt i v říši živočišné, dávají například charakteristické zbarvení plameňáků, kanárek, raků nebo třeba slunéčka sedmitečného. Z chemického hlediska je lze řadit do skupiny terpenoidů, tzn. látek odvozených od izoprenové podjednotky. Používají se především jako nezávadná, přirozená barviva v potravinářském a kosmetickém průmyslu. V rostlinném organismu jsou nezbytné pro růst a fotosyntézu, pro člověka pak jsou nezastupitelným zdrojem vitamínu A, jehož jsou prekurzorem. V současné době se také hovoří o jejich schopnosti snižovat některá rizika rakoviny, hojně se využívají také jako antioxidanty zachycující pro organismus nebezpečné volné radikály.



Lykopen (rajče)



Beta-karoten (mrkev)



Kapsantin (paprika)

Obr. 7: Nejznámější typy karotenoidů.

Extrakt z papriky (*Capsicum annum*) obsahuje 37 – 54 pigmentů (počet závisí na způsobu izolace), z toho většina z nich je na bázi karotenoidů (Obr. 7). Hlavním pigmentem papriky je červený kapsantin a kapsorubin, žluto-oranžový beta-karoten, žluté luteiny a xantofyly. Karotenoidy z papriky budete chromatografovat v nepolárním benzenu. Mobilita jednotlivých molekul závisí na jejich polaritě, tzn. především na počtu hydroxy- skupin.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Skleněná vana	Odpařovací miska
Malá skleněná deska	Umělohmotné zátky
Velká skleněná deska	Váženka
Skleněná tyčinka s gumičkami	Špachtle/lžička
Odměrné válce (10 ml, 250 ml)	Předvážky
Třecí miska s tloučkem	Petriho miska
Automatická pipeta s rozsahem 20-200 μ l	Filtrační papír
Kádinka (50 ml)	Tužka, nůžky, pravítko
Skleněná nálevka	Petriho miska
Filtrační papír	Silufol
Filtrační kruh	Polystyrenový kruh
Laboratorní stojan	Vodní lázeň (v digestoři)

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Červená paprika
Oxid hlinitý pro chromatografii
Benzín
Benzen

POSTUP:

POZOR: Pracujete s karcinogenním benzenem. Chraňte se rukavicemi a pracujte v digestoři!

1. Odvažte 1 g suché papriky a ve třecí misce jej rozetřete s 10 ml směsí benzín-benzen (4:1). Karotenoidy společně s dalšími látkami přejdou do rozpouštědla.
2. Extrakt odfiltrujte přes hladký suchý filtr do kádinky. Pozor: veškeré sklo musí být dokonale suché!
3. Na vodní lázni zfiltrovaný extrakt odpařte do sucha a odparek rozpustíme v 1 ml čistého benzínu.
4. Příprava sypané tenké vrstvy: menší skleněnou destičku si položte na stůl a na jeden z jejích konců nasype hromádku oxidu hlinitého určeného pro chromatografii.
5. Pak opatrně skleněnou tyčinkou na konci s gumičkami projedte po celé délce skla, tak, aby se na jeho povrchu vytvořila jednolitá vrstva oxidu hlinitého.
6. Destičku opatrně chytněte za hrany a přeneste do ploché skleněné vany, na jejíž jeden konec jsou položeny dvě umělohmotné zátky (viz Obr. 2).
7. Destička je umístěná šikmo pod úhlem asi 20°. Asi centimetr od spodního okraje naneste jako souvislou čáru na sypanou vrstvu extrakt z papriky v délce okolo 3 centimetrů. Vzorek nanášejte automatickou pipetou.
8. Na dno nádoby nalijte čistý benzen tak, aby začal vzlínat po destičce nahoru. Nádobku překryjte velkým sklem.
9. Chromatogram nechte vyvíjet a sledujte rozdělování jednotlivých barviv.

10. Stejný vzorek extraktu z papriky rozdělte vzestupnou chromatografií na vrstvě silufolu.
11. Z folie silufolu si odstříhnete pruh asi o šířce 1-1,5 cm. Silufol stříhejte v rukavicích, abyste ho zbytečně neznečistili.
12. Asi 1 cm od jednoho konce folie opět naneste vzorek. Pruh silufolu umístěte do odměrného válce, na jehož dno jste nalili mobilní fázi – benzen. Dbejte na to, aby hladina rozpouštědla nezasahovala do naneseného vzorku.
13. Válec uzavřete převrácenou kádinkou a nechte chromatogram vyvíjet.
14. Jakmile rozpouštědlo doputuje na horní konec folie, chromatogram vyjměte a nechte na vzduchu oschnout.

VYHODNOCENÍ:

1. Porovnejte účinnost obou provedení tenkovrstevné chromatografie a rozhodněte, které dělení je lepší.
2. Vyvinutý chromatogram na silufolu vyfoťte do protokolu a podle barvy jednotlivých pruhů se pokuste určit, o které karotenoidy jde. V potaz berte i polaritu jejich molekul.
3. Vypočtete retenční faktory pro jednotlivá barviva z chromatografie na silufolu.

4. Elektromigrační metody

Elektromigrační metody jsou metody, které se využívají k separaci makromolekul na základě náboje, konformace nebo velikosti. Migrace nabité částice v elektrickém poli je ovlivňována interakcí mezi ionty a závisí především na celkovém náboji, velikosti a tvaru částice a viskozitě prostředí.

Elektromigrační metody využívají dvou elektrokinetických jevů – **elektroforézy** a **elektroosmózy**. Při dotyku pevných povrchů, které mohou nést elektrické náboje, s roztokem obsahujícím nabitou částici (ionty) se vytváří elektrické dvojsvrstvy. V elektromigračních metodách je na toto prostředí připojeno **stejnoseměrné elektrické pole**, které poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá tak jejich pohyb. Principem separace složek je rozdílná rychlost jejich migrace, neboť nabitou částici různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí.

Elektroforéza tedy spočívá v **migraci elektricky nabitých částic ve stejnoseměrném elektrickém poli**, které se vytvoří vložením konstantního stejnoseměrného napětí mezi elektrody. V zónové elektroforéze je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem (roztok obsahující ionty), který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost celého systému, přičemž zkoumaný vzorek je dávkován v určitém místě tohoto systému. Kationty (kladně nabitou ionty) migrují k záporně nabitou elektrodě (**katodě**), anionty (záporně nabitou ionty) migrují ke kladně nabitou elektrodě (**anodě**), neutrální částice se nepohybují. V průběhu separace se vytvářejí oddělené zóny (odtud název zónová elektroforéza) na základě odlišné rychlosti migrace složek vzorku.

Elektroforetická pohyblivost

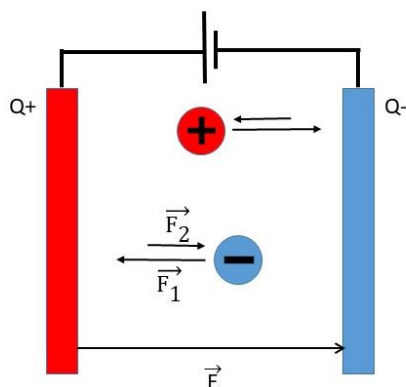
Elektroforetická pohyblivost μ_e nabitou částice je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě E^0 . Pokud jsou na začátku separace částice v jednom místě, dostávají se během separace dopředu nabitou částice s vyšší pohyblivostí, částice s nižší pohyblivostí se opožďují.

Na nabitou částici o náboji Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly – **elektrická síla** F_1 , která částici uvádí do pohybu, a **odpor prostředí** F_2 , který částici v pohybu brzdí (viz Obr. 1). Tyto síly definují vztahy:

$$F_1 = Q \cdot E,$$

$$F_2 = k \cdot v.$$

Koeficient k závisí na tvaru a velikosti částice a na viskozitě prostředí η .



Obr. 1: Síly působící na nabitou částici ve stejnosměrném elektrickém poli. F_1 – elektrická síla, F_2 – odpor prostředí.

V počátečním okamžiku je rychlost částice v nulová, proto síla F_1 uvede částici do pohybu. S rostoucí rychlostí v se síla F_2 zvětšuje, dokud se nevyrovná síle F_1 . Nastane stacionární stav, ve kterém se nabitě částice pohybují konstantní rychlostí a platí:

$$F_1 = F_2 \rightarrow Q \cdot E = k \cdot v.$$

Pro elektroforetickou pohyblivost je pak platný vztah:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{Q}{k}.$$

V roztocích slabých elektrolytů vedle sebe koexistují disociované a nedisociované molekuly, přičemž podíl nabitých částic je určen stupněm disociace α , který je definován vztahem:

$$\alpha = \frac{n_i}{n_{i,0}},$$

kde: $n_{i,0}$... počáteční látkové množství ještě nedisociovaných molekul
 n_i ... látkové množství disociovaných molekul.

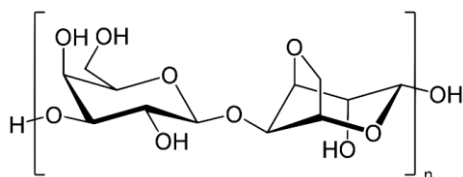
Stupeň disociace tedy může nabývat hodnot $<0;1>$. Molekula elektrolytu vykazuje efektivní elektroforetickou pohyblivost danou součinem $\alpha \cdot \mu_e$. Disociaci slabých kyselin a zásad lze měnit volbou pH prostředí a tím také ovlivnit separaci těchto látek.

Elektroforéza v biologických vědách

V současné době se biochemický, molekulárně-biologický a biotechnologický výzkum bez této elektromigrační separační techniky neobejde. Nejčastěji je v těchto odvětvích využívána gelová elektroforéza, která slouží k izolaci a analýze nukleových kyselin nebo proteinů.

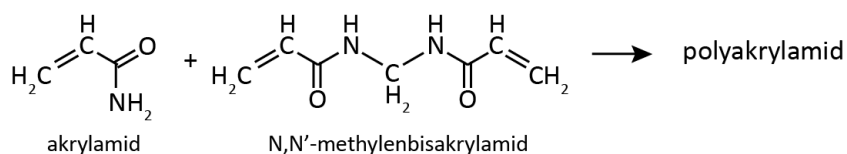
Jako nosiče se často využívají agarosové nebo polyakrylamidové gely. U těchto gelů je možné ovlivnit velikost pórů a tím dosáhnout dělení nejen z hlediska rozdílné elektroforetické pohyblivosti, ale také na základě velikosti molekuly.

Agarosové gely jsou vhodné zvláště pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti 100 až 50 000 párů bází. Agarosa je polysacharid pocházející z mořských řas, který sestává ze střídajících se galaktosových a 3,6-anhydrogalaktosových podjednotek (viz Obr. 3). Velikost pórů je zde ovlivněna koncentrací agarosy v gelu.



Obr. 3: Molekula agarosy.

Polyakrylamidové gely jsou využívány spíše pro separaci molekul proteinů. Tyto gely vznikají polymerací akrylamidu (AA) a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS) (viz Obr. 4), která je zahájena volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného (APS). Do směsi je vždy přidáván stabilizátor volných radikálů TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethlendiamin). Fyzikální vlastnosti gelu a velikosti pórů jsou zde dány podílem polyakrylamidu a stupněm zesíťování (lineární řetězce vznikají spojováním monomerů AA, příčné vazby mezi nimi jsou tvořeny BIS, stupeň zesíťování ovlivňuje tedy poměr AA/BIS).

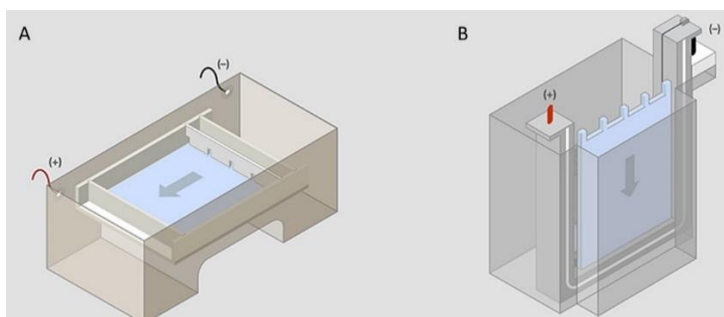


Obr. 4: Schématické znázornění vzniku polyakrylamidového gelu.

Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře se rozlišuje:

- elektroforéza v horizontálním uspořádání (Obr. 5A),
- elektroforéza ve vertikálním uspořádání (Obr. 5B).

Dále mohou mít tyto elektroforetické aparatury deskové nebo kapilární uspořádání, kdy je gel uzavřen uvnitř tenké kapiláry.

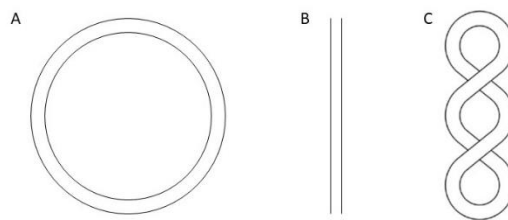


Obr. 5: Uspořádání elektroforetických aparatur. A – horizontální uspořádání; B – vertikální uspořádání.

Elektroforéza DNA

Při posuzování elektroforetické pohyblivosti molekuly DNA není třeba se zabývat velikostí náboje, protože ten je v molekule rovnoměrně rozložen díky fosfátovým zbytkům. Elektroforéza nukleových kyselin je výhodnou metodou při studiu konformace molekul DNA. Superhelikální molekuly DNA (molekuly DNA s nadšroubovicovým vinutím) vykazují v gelové elektroforéze vyšší elektroforetickou pohyblivost oproti lineární nebo kruhové konformaci. Jednotlivé konformace molekul DNA jsou představeny na obrázku 6. Jak již bylo zmíněno, koeficient k je závislý na tvaru molekuly, díky tomu se odlišný tvar molekuly projeví v elektroforetické pohyblivosti. Dále pak je možné tuto metodu využít ke stanovení molekulové hmotnosti nebo délky molekuly DNA porovnáním její elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí standardu, kterým bývá směs fragmentů o přesně známé velikosti a hmotnosti.

Jelikož jsou molekuly DNA okem neviditelné, je třeba výsledek separace nějak zobrazit. Využívá se zde možnosti barvení molekul interkalačními barvivy, kdy se barvivo vmezuje mezi sousední páry bází DNA šroubovice. Takovými barvivy jsou například ethidium bromid (pozor, potenciální silný mutagen), SyberGreen nebo GelRed. Po ozáření separované DNA obarvené ethidium bromidem pod UV lampou se DNA jeví jako oranžové proužky, jejichž intenzita je přímo úměrná koncentraci DNA. Molekuly DNA mohou být značeny taky radioaktivně, potom následuje detekce autoradiografická. V případě použití polyakrylamidového gelu je DNA vizualizována barvením stříbrem (roztok AgNO_3).



Obr. 6: Konformace molekul DNA.

A – kruhová molekula DNA; B – lineární molekula DNA; C – superhelikální molekula DNA

Elektroforéza proteinů

Gelová elektroforéza má v biochemii uplatnění při stanovení molekulové hmotnosti proteinů, stanovení izoelektrického bodu, detekci enzymové aktivity, stanovení izoenzymových spekter nebo k separaci biologicky aktivních molekul.

Elektroforéza proteinů může probíhat buď v nativním, nebo v denaturujícím prostředí. Nativní gelová elektroforéza má tu výhodu, že nedochází k degradaci proteinů a enzymy si zachovávají svou enzymovou aktivitu. Molekuly proteinů zde migrují v závislosti na velikosti celkového náboje, velikosti a tvaru molekuly. Naopak při použití detergentů dochází k denaturaci proteinů. Jako detergenty jsou používány dodecylsulfát sodný (SDS) a β -merkapt ethanol, které rozrušují disulfidické vazby proteinů, které tak získají tyčinkovitý tvar, proteiny mají stejnou hustotu povrchového náboje a rychlost migrace potom závisí pouze na molekulové hmotnosti (velikosti) proteinu.

Vizualizace proteinů v gelu se provádí nejčastěji barvením pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue v roztoku methanolu a kyseliny octové nebo je možné proteiny barvit stříbrem.

Potravinářská barviva

Potravinářská barviva mají důležitou roli ve vnímání a očekávání spotřebitele. Například při konzumaci fialového bonbonu očekává chuť hroznového vína, při konzumaci červeného nápoje je očekávána jahodová chuť apod.

Barviva mohou být přírodního původu nebo mohou být dodávána barviva synteticky připravená. Přírodní barviva mohou pocházet například ze šafránu (žlutá barva), červené řepy (červená barva), špenátu (zelená) atd.

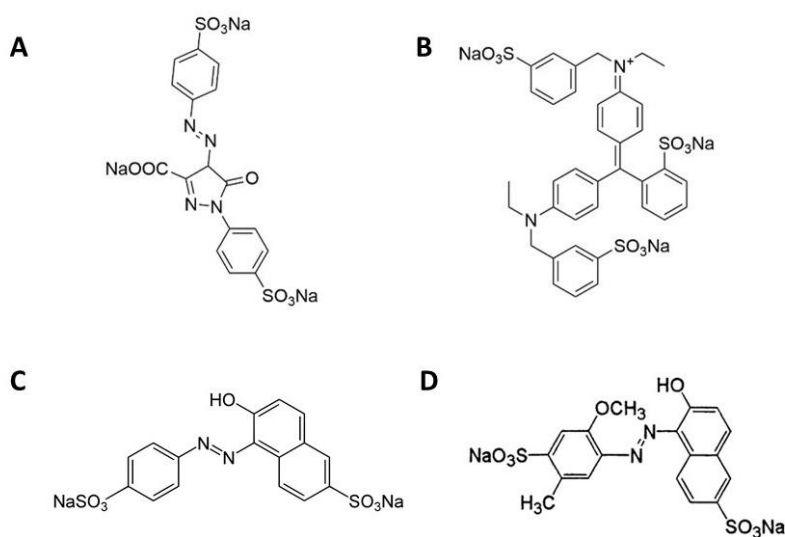
V minulosti se další barvy získávaly přidáním anorganických solí, mezi které patřily například chroman olovnatý $PbCrO_4$ (žlutá barva) nebo sulfid rtuťnatý (červená barva – rumělka). Používání těchto barviv pro potravinářské účely nebylo dlouhou dobu regulováno, dokud roku 1820 nevyšla kniha Fredericka Accumy s názvem *A Treatise on Adulterations of Food, and Culinary Poisons*, kde se na použití těchto nebezpečných barviv zaměřil. Objevil například již zmíněný chroman olovnatý v kajenském pepři a sýrech nebo síran měďnatý v nakládaných okurkách.

Roku 1856 anglický chemik William Henry Perkins omylem během pokusu o syntézu chininu (lék proti malárii) připravil první organické barvivo s názvem „mauvein“ (methylová violeť, Perkinova violeť). Jedná se o anilinové barvivo a zdrojem pro jeho přípravu byl uhelný dehet.

Dnešní barviva jsou taktéž deriváty připravené z kamenouhelného dehtu, případně z ropy. Seznam nejčastěji používaných barviv shrnuje tabulka 1.

Tab. 1: Přehled vybraných potravinářských barviv.

Barvivo	Barva	Označení	Relativní molekulová hmotnost	Velikost náboje při pH=8	Pozn.
Košenila (karmín)	červená	E 120	492,38	N/A	původ: vysušená těla červce nopálového
Brilantní modř FCF	jasně modrá	E 133	792,86	-2	potravinářská modř 2; uh. dehet
Indigotin	tmavě modrá	E 132	466,36	-2	potravinářská modř 1; uh. dehet
Erythrosin	červená	E 127	879,86	-1	potravinářská červeň 17; uh. dehet
Tartrazin	citronově žlutá	E 102	534,37	-3	potravinářská žluť 4 (5); uh. dehet
Žluť SY	oranžová	E 110	452,37	-2	potravinářská žluť 3 (6); uh. dehet
Červeň Allura AC	červená	E 129	496,43	-2	potravinářská červeň 40; uh. dehet a ropa



Obr. 7: Chemické struktury vybraných potravinářských barviv. A – Tartrazin (E 102); B – Brilantní modř FCF (E 133); C – Žluť SY (E 110); D – Červeň Allura AC (E 129).

ÚKOL Č. 1: Gelová elektroforéza potravinářských barviv

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Kádinky (25 ml, 150 ml, 1000 ml)
 Automatické pipety, špičky
 Mikrokumavky + stojánek
 Erlenmeyerova baňka (100 ml)
 Odměrné válce (25 ml, 100 ml, 1000 ml)
 Váženka

Lžička/špachtle
 Předvážky
 Mikrovlnná trouba
 Aparatura pro agarosovou elektroforézu
 Zdroj konstantního napětí

CHEMIKÁLIE A MATERIÁL:

Bonbony Skittles
 Extrakční pufr (Tris/acetátový pufr pH=8.0)
 Agarosa
 50x TAE pufr

POSTUP:

A. Příprava vzorků

1. Do kádinek vložte 1 až dva bonbony Skittles jednotlivých barev.
2. Do kádinek napipetujte 500 μ l extrakčního pufru.
3. Z bonbonů se bude postupně uvolňovat barvivo, uvolňování můžete urychlit občasným promícháním.
4. Barvivo extrahujte do doby, než je na povrchu bonbonu pouze bílá cukerná vrstva a připravený roztok barviva je dostatečně sytý (barevný).
5. Do popsaných mikrozkušavek napipetujte extrahovaná barviva.

B. Příprava agarosového gelu

1. Sestavte si aparaturu pro gelovou elektroforézu v horizontálním uspořádání dle pokynů vedoucího cvičení.
2. Naředte si potřebné množství 50x koncentrovaného TAE pufru. Na přípravu gelu budete potřebovat 80 ml 1x koncentrovaného TAE pufru, na elektroforézu 700 ml 1x koncentrovaného TAE pufru. Postup ředění konzultujte s vedoucím cvičení.

Tab. 2: Ředění zásobního roztoku 50x koncentrovaného TAE pufru.

Finální objem 1x koncentrovaného TAE pufru	80 ml	700 ml
50x koncentrovaný TAE pufr [ml]		
Destilovaná voda [ml]		

3. Vypočtete navážku agarosu, tak aby její koncentrace v gelu byla 1 %. Výsledek konzultujte s vedoucím cvičení.
4. Naváženou agarosu přeneste do Erlenmeyerovy baňky, přilijte odpovídající množství 1x TAE pufru a opatrně promíchejte krouživým pohybem baňky.
5. Dle pokynů vedoucího cvičení sestavte elektroforetickou komůrku.
6. Agarosu je třeba rozpustit zvýšenou teplotou. Erlenmeyerovu baňku s agarosou tedy vložte do mikrovlnky, kterou budete pouštět na velmi krátké časové intervaly. Baňku je během zahřívání nutné často promíchat. **Pozor, používejte ochranné rukavice!** Agarosa během zahřívání často vzkypí a z baňky vyteče ven, zvláště v takto malém objemu. **Budte obezřetní a při každém náznaku varu, mikrovlnku okamžitě vypněte.** Pokud by se stalo, že agarosa přeteče z baňky ven, je třeba celý prostor mikrovlnky vyčistit a agarosu připravit znovu.
7. Agarosu nalijte do elektroforetické komůrky, vložte hřebínek a nechejte přibližně 20 min tuhnout.

C. Elektroforéza potravinářských barviv v agarosovém gelu

1. Během tuhnutí agarosového gelu navrhnete způsob připojení elektroforetické vany ke zdroji stejnosměrného napětí tak, aby barviva po připojení napětí putovala gelem správným směrem.

Elektrody mají zavedené následující značení:

- červená – anoda (kladný náboj)
- černá – katoda (záporný náboj)

Zdůvodněte návrh zapojení s ohledem na údaje uvedené v Tab. 1.

2. Ztuhlý agarosový gel vložte do elektroforetické komůrky, do komůrky nalijte 1x koncentrovaný TAE pufr tak, aby byl agarosový gel plně ponořen, nebo po vyznačenou rysku.

3. Opatrně tahem nahoru vyndejte hřebínek, který vytvořil jamky pro nanesení vzorků.
4. Do jamek pipetujte 20 µl vámi extrahovaných barviv. Pipetujte pomalu, dejte pozor, ať dno jamky nepropíchnete špičkou pipety. Pořadí barviv si zapište nebo vyfotťe.
5. Na elektroforetickou komůrku nasadte víko, připojte elektrody ke zdroji napětí.
6. Zapněte zdroj napětí a nastavte konstantní napětí 45 V. Spusťte elektroforézu a nechejte ji běžet zhruba 20 min. Průběžně kontrolujte průběh elektroforézy.
7. Po řádném rozdělení barviv vypněte zdroj napětí, sundejte víko. Gel přeneste na podložku a vyfotťe si jej.

VYHODNOCENÍ:

1. Bonbony Skittles se barví pomocí následujících barviv – E162, E163, E170, E160a, E100, E132, E133. Pokuste se přiřadit tato barviva jednotlivým pruhům na agarosovém gelu.
2. Která z barev se pohybovala v gelu nejrychleji, která se pohybovala nejpomaleji? Zdůvodněte.
3. U některých barviv se mohou objevit dva pruhy různých barev. Čím tuto skutečnost vysvětlíte?
4. Jak by se v agarosovém gelu pohybovala kladně nabitá molekula a molekula bez náboje? Vysvětlete.

5. Extrakce, filtrace, sublimace a práce s vakuovou odparkou

Extrakce

Jako extrakce je označováno převedení látky z jedné fáze, v níž je rozpuštěna nebo suspendována, do fáze jiné. Toto převedení je možné, neboť látka se v určitém poměru rozdělí mezi obě fáze. Distribuce rozpuštěné látky mezi dvě kapalně fáze se řídí **Nernstovým rozdělovacím zákonem**:

$$\frac{c_a}{c_b} = K$$

Podle něj je poměr koncentrací určité látky ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (označených „a“ a „b“) při určité teplotě a po dosažení rovnováhy konstantní. **K** se nazývá **rozdělovací koeficient**.

Extrakce látky je snadná tehdy, jestliže je v extrakčním rozpouštědle mnohem lépe rozpustná než v druhé fázi – čili je-li rozdělovací koeficient značně odlišný od jedničky. Pro látky s rozdělovacím koeficientem menším než 100 jediná extrakce nestačí. V takovém případě je nutno extrakci vícekrát opakovat s čerstvým rozpouštědlem.

Pro jednotlivé typy extrakce se historicky vyvinula některá označení, která budou společně se stručnými definicemi uvedena:

A. Digesce

Látka v pevné fázi je za tepla extrahována opakovanou dávkou rozpouštědla. Nejčastěji se tuhá látka zahřívá společně s rozpouštědlem pod zpětným chladičem a směs je poté filtrována nebo dekantována. Nejčastěji se používá **Soxhletův přístroj**, v němž je extrakt stále zahušťován. Přístroj pracuje automaticky. Ve varné baňce je rozpouštědlo, později již roztok, které se odpařuje a jeho páry odcházejí širokou trubicí na levé straně středního dílu přístroje (Obr. 1A) do zpětného chladiče. Zde dochází k jejich kondenzaci. Čisté rozpouštědlo stéká do papírové patrony, v níž je umístěn extrahovaný materiál. Hladina roztoku ve střední části přístroje neustále stoupá. V okamžiku, kdy její výška dosáhne úrovně horní části tenké přepadové trubičky, dojde k jejímu přetečení zpět do varné baňky. Tak je možno vyextrahovat značné množství látky s malým množstvím rozpouštědla.

B. Macerace

Látka v pevné fázi je za studena opakovaně extrahována dávkami rozpouštědla.

C. Perkolace

Látkou v pevné fázi prosakuje vlastní tíhou rozpouštědlo. Přívodem čistého rozpouštědla je hladina kapaliny v **perkolátoru** (Obr. 1B) udržována stále ve stejné výši. To zabezpečuje, aby na extrahovaný materiál v horních vrstvách přicházelo stále nové rozpouštědlo.

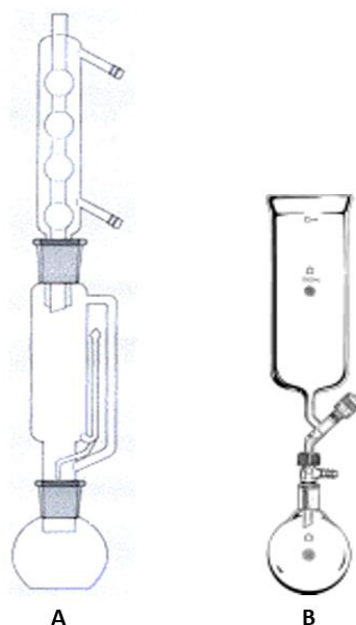
D. Vytřepávání

Látka je z roztoku extrahována jednou dávkou rozpouštědla nebo opakovaně dalšími dávkami (frakční vytřepávání). Vytřepávání se provádí tak, že vodný roztok, nebo méně často suspenze látky, se smísí v **dělicí nálevce** s přibližně $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{4}$ objemu extrakčního činidla. Dělicí nálevka smí být naplněna nejvýše do $\frac{2}{3}$ objemu. Nejdříve je třeba dělicí nálevku uzavřít zábrusovou zátkou a protřepat, přičemž je nutné držet zátku i kohout. Pak se dělicí nálevka otočí vypouštěcí stopkou vzhůru a otevřením kohoutu se zruší vzniklý přetlak. Třepání a odpouštění tlaku se opakuje obvykle 3-4 x. Při práci s kyselinami, zásadami či jinými žíravinami je nutné používat ochranné pomůcky! Jednotlivé fáze se většinou oddělí po chvíli stání. Spodní vrstva se vypouští kohoutem, horní se odlévá hrdlem dělicí nálevky.

Jedním vytřepáním extrakční výtěžky bývají většinou nízké, v optimálním případě odpovídají Nernstovu rozdělovacímu zákonu. Extrakci je proto potřeba provést vždy nejméně 3-4 x. Účinnější je vždy opakovaná extrakce menším množstvím rozpouštědla než extrakce celým množstvím najednou.

Nejčastěji používaná extrakční činidla jsou:

- **Lehčí než voda:** diethylether, benzen, hexan, ethylacetát
- **Těžší než voda:** methylenchlorid, chloroform, chlorid uhličitý



Obr. 1: Extrakční aparatury. A – Soxhletův přístroj, B – perkolátor.

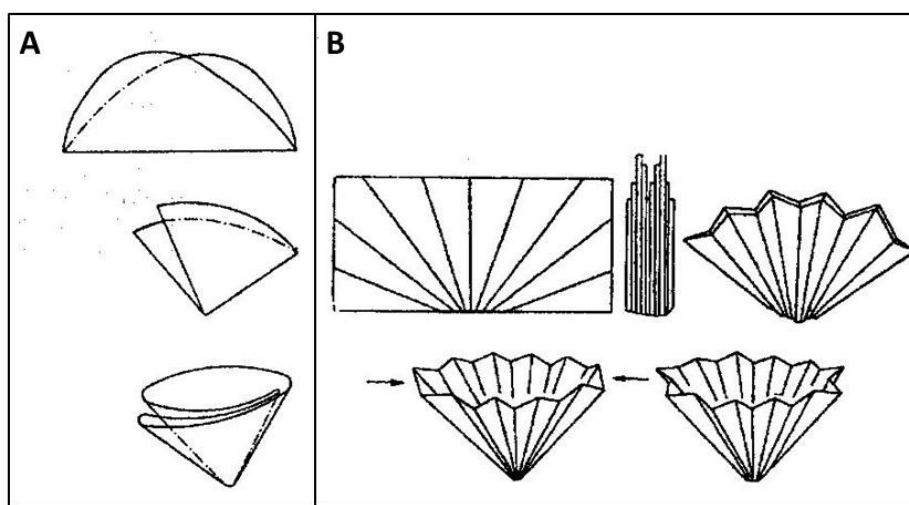
Filtrace

Filtrace je oddělování fází pomocí propustného materiálu, který dovoluje průchod pouze jedné z obou fází. Obvykle se pod pojmem filtrace rozumí oddělování pevné fáze od kapaliny nebo plynu. Filtrace je v laboratoři velice běžnou operací. Nejčastější je filtrace kapalin, prováděná buď za účelem zbavení kapaliny mechanických nečistot, nebo k izolaci pevné složky, např. při krystalizaci.

Filtrační materiál je určován chemickým charakterem filtrovaného roztoku. Může to být neklížený, tzv. filtrační papír nebo i pórovitá skleněná nebo porcelánová frit, vrstva azbestu nebo skelné vaty apod. Rychlost filtrace závisí na ploše a vlastnostech filtračního prostředí, na počtu a velikosti pórů, na tlaku a teplotě při filtraci, na povaze sraženiny i na viskozitě filtrované kapaliny.

Základní pomůckou při filtraci je filtrační nálevka, do níž se vkládá vhodně složený papírový filtr. Filtrační papír je vyráběn s různou velikostí pórů. Filtr se zhotovuje ze čtverce filtračního papíru složeného pravouhle na čtvrtiny a sestřiženého do tvaru kruhové výseče (Obr. 2). Rozevřením takto upraveného papíru vzniká kuželový filtr, který je z jedné poloviny trojnásobný a z druhé jednoduchý.

Tento tzv. **hladký filtr** (Obr. 2A) filtruje pouze špičkou a poměrně pomalu. Rychleji pracuje **filtr skládaný**, nazývaný též **francouzský** (Obr. 2B). Připraví se z kruhové výseče, která je vějířovitě překládána směrem od středu k obvodu. Při skládání francouzského filtru je nutno dbát, aby při několikerém překládání nedošlo k poškození filtru ve špičce. Je proto nezbytné, aby jednotlivé záhyby neprocházely jedním bodem. Před vložením do nálevky se doporučuje složený filtr rozevřít a obrátit tak, aby původně vnější stěna filtru tvořila vnitřní stěnu. Tím je možné předejít znečištění filtrátu vláknou papíru uvolněnými během skládání a nečistotami z rukou. Skládaný filtr se opírá o stěny nálevky jen hranami, a proto filtruje téměř celou svou plochou na rozdíl od hladkého filtru, který filtruje jen špičkou. **Filtrace francouzským filtrem je podstatně rychlejší než filtrace hladkým filtrem téhož průměru.**

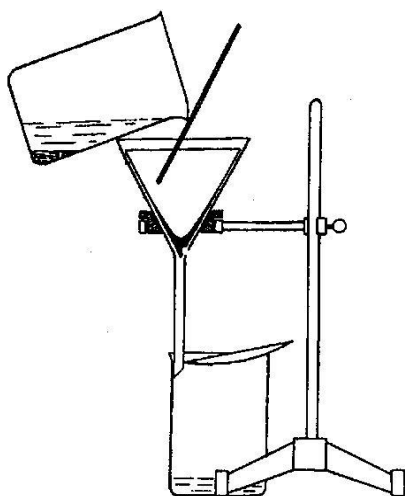


Obr. 2: Možnosti skládání filtrů. A – hladký filtr; B – skládaný (francouzský) filtr.

Nálevka s filtrem se vkládá do filtračního kruhu připevněného na železném stojanu. Pod ní je umístěna kádinka pro zachycování filtrátu. Stonek nálevky se při filtraci dotýká špičkou svého šikmo seříznutého stonku stěny kádinky přibližně ve dvou třetinách výšky (Obr. 3), filtrát pak klidně stéká po stěnách nádoby a nevystřikuje. Při filtraci naléváme roztok na filtr po skleněné tyčince, která se ve vhodném úhlu přiblíží stěně filtru. Proud kapaliny je vždy třeba směřovat proti místu, kde je papírová vrstva trojitá. Sníží se tím nebezpečí protržení filtru. Filtr se plní vždy několik milimetrů pod okraj. Při filtraci sraženiny je vhodné ji nechat usadit u dna kádinky a na filtr nejprve nalévat čirý matečný roztok, který rychle protéká ještě nezaneseným filtrem. Teprve nakonec se ve zbytku kapaliny rozvíří sraženina a vše se nalije na filtr.

Při promývání sraženiny na filtru se sedlina nejprve pomocí stříčky spláchně do spodní části filtru. Proud vody je třeba řídit od okraje filtru k jeho špičce. Promývání se provádí tak dlouho, až je reakce filtrátu negativní na látku přítomnou v matečném roztoku. Důkaz se provádí citlivým činidlem v malém podílu filtrátu.

Pro horké roztoky, u nichž hrozí, že se při ochlazení část rozpuštěné látky vyloučí na filtru a ucpe jeho póry je nutno používat nálevky s vyhříváním pláštěm. Plášť může být vyhříván horkou vodou nebo elektricky. Jednoduše je možno improvizovat **filtraci za horka** nálevkou se seříznutým stonkem, která je položena na hrdle kádinky. Plášť nálevky je pak přímo vyhříván párami vroucího roztoku.



Obr. 3: Aparatura pro filtraci za normálního tlaku.

Filtraci je možno podstatně urychlit použitím sníženého tlaku, odsáváním vzduchu v prostoru pod filtrem. Pro filtraci za sníženého tlaku se používají **Büchnerovy nálevky**, skleněné nebo porcelánové nuče a filtrační kelímky. Nejjednodušší zařízení pro **filtraci za sníženého tlaku** je Büchnerova nálevka s odsávací baňkou. Dno Büchnerovy nálevky je jemně dírkované, na něj se pokládá filtrační papír tak, aby všechny otvory byly zakryty a papír nepřechýlil podél stěn nálevky vzhůru, poněvadž by vzniklými kanálky procházel filtrovaný roztok do odsávací baňky. Nálevka je v odsávací baňce upevněná pryžovou vložkou nebo zátkou. Mezi odsávací baňku a vývěvu je vhodné umístit pojistnou láhev (prázdnou promývačku), která zabraňuje vniknutí vody z vývěvy do odsávací baňky nebo roztoku do vývěvy. Vniknutí vody do odsávací baňky se zabrání tak, že se baňka odpojí od vývěvy před zastavením toku vody ve vodní vývěvě.

Při filtraci látek reagujících s filtračním papírem (koncentrované kyseliny, KMnO_4 apod.) se používají skleněné frity, kde funkci filtračního papíru zastává do filtračního kelímku vtavená skleněná pórovitá destička. Velikost pórů je odstupňována v řadě S1-S2-S3-S4-S5, velmi malé póry jsou určeny pro filtraci biologických materiálů. Vzhledem k značné hustotě frit je filtrace pomalá a filtrace probíhá vždy za použití sníženého tlaku. Nevýhodou skleněných frit je jejich značná cena, a hlavně jejich obtížné čištění.

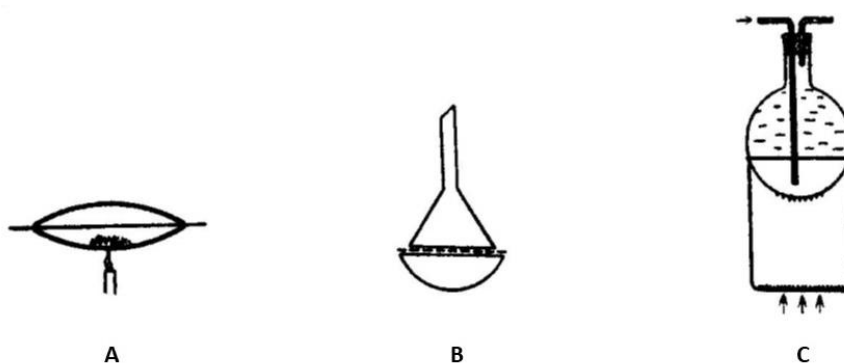
Sublimace

Sublimace je podobně jako krystalizace jednou ze základních metod čištění a oddělování jednotlivých složek směsi. Děj je založen na tom, že tenze par pevných látek se s rostoucí teplotou zvyšuje, a proto lze mnohé látky převést do plynného skupenství, aniž roztají, a páry mohou opět přímo desublimovat v pevnou látku. Bod sublimace je teplota, při níž se tenze par pevné látky vyrovná s vnějším tlakem. V porovnání s krystalizací má sublimace v mnoha případech značné výhody. Sublimovaný preparát totiž neobsahuje mechanické nečistoty, které i při pečlivé krystalizaci mohou doprovázet výsledný

produkt. Při sublimaci jednoduchých směsí se obvykle pracuje s malými ztrátami a jednoduchá sublimace často nahradí i několikrát opakovanou krystalizaci. Vhodnost použití sublimace jako čistící a separační techniky záleží na vlastnostech dané látky. Rozmezí teplot a tlaků, za nichž lze sublimaci použít, je možno zjistit ze stavového diagramu příslušné látky (viz fyzikální chemie).

Zařízení a způsob sublimace se řídí podle toho, jaké vlastnosti má mít sublimát. Čím nižší je teplota chlazeného prostoru, v němž páry kondenzují, tím jemnější krystaly se vytvářejí. Vyšší kondenzační teploty podporují naopak vznik větších a vyvinutějších krystalů. Nejjednodušším zařízením pro provedení sublimace s nepříliš nízkou sublimační teplotou mohou být dvě zabroušená hodinová skla (Obr. 4A). Na spodní sklo se umístí sublimovaná látka, přikryje se druhým sklem a opatrně zahřívá. Sublimující látka se usazuje na horním hodinovém skle. V případě, že sublimovaná látka padá do surového produktu, lze mezi skla položit perforovaný filtrační papír, na němž se sublimovaná látka zachytí. Jiným jednoduchým zařízením je porcelánová miska a na ní postavená nálevka (Obr. 4B). Nálevka má mít o něco menší průměr než miska. Stonek nálevky se opatří volnou vatovou ucpávkou. Mezi miskou a nálevkou se opět vloží perforovaný filtrační papír.

V případě, že sublimační teplota je nízká, použije se pro sublimaci aparatura znázorněná na obrázku 4C. Surový produkt je nasypán na dno suché kádinky, která se uzavře baňkou. Do baňky je zaváděna až ke dnu stále čerstvá chladící voda. Sublimující látka se pak usazuje na kulatém dně baňky. Po skončení sublimace je baňka opatrně sejmuta a usazené krystaly špachtlí oškrabány. Látky při normálním tlaku nesublímující nebo sublimující jen pomalu, případně látky, které se při sublimaci za vyšší teploty rozkládají, lze často sublimovat při sníženém tlaku.



Obr. 4: Různé způsoby sublimace.

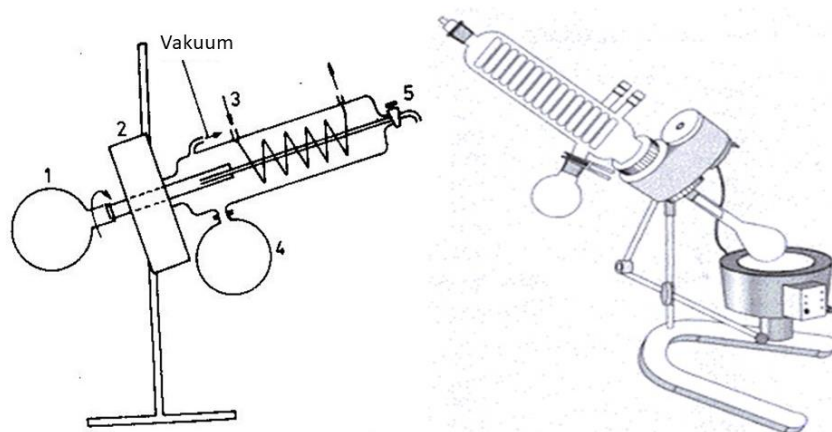
Odpařování ve vakuu

Odpařování ve vakuu je v biochemické laboratoři jeden z nejčastějších způsobů odpařování rozpouštědla z roztoků látek. Dá se použít na roztoky jak nízkomolekulárních, tak vysokomolekulárních látek, jejichž objem může být od několika mililitrů až po litry a využívá se při něm efektu snížení bodu varu při sníženém tlaku v systému.

Odpařování malých objemů do 2 ml se dělá v evakuovaném exikátoru nad vhodným sorbentem vody (P_2O_5 , NaOH, $CaCl_2$). Vzorek se umísťuje do mikrozkušavky nebo jiné vhodné nádoby, která je v exsikátoru uložena tak, aby vodní páry měly k sušidlu co nejkratší cestu. Hlavní výhodou této metody

je, že je levná a dostupná v každé laboratoři, nevýhodou je dlouhý čas (řádově hodiny) a nemožnost odpařit jiné rozpouštědlo než vodu. Nevýhody se odstraňují přístroji pracujícími na podobném principu, kde se páry rozpouštědla neustále odsávají. Při vakuovém zahušťování roztoků, kde je použito organické rozpouštědlo, nastává utajený var. Utajený var je metastabilní stav, který vznikne přehřátím kapaliny o několik stupňů nad její bod varu. Náhodný impuls pak vyvolává prudký var, vzkypění a přetečení destilované směsi chladiče nebo odpadní baňky. Aby se zabránilo vzniku utajeného varu, vkládají se do varné baňky tzv. varná tělíska (skleněné kuličky, úlomky polévaného porcelánu, drcená cihla, varné kamínky apod.). Riziko vzniku utajeného varu lze odstranit také například odpařováním vzorku za současné centrifugace. Zařízení se obvykle skládá z centrifugy, která může být vyhřívána, z vymrazovací části a z vakuové pumpy.

Nejběžnější způsob odpařování středních objemů je **odpařování na vakuové rotační odparce** (Obr. 5). Rotační vakuová odparka se skládá z odpařovací baňky, pohonné jednotky a z vhodného chladiče s kondenzační baňkou a musí být doplněná zdrojem vakua (vodní vývěva, membránová vývěva). Odpařovací baňka se většinou během odpařování ponoří do vodní lázně, kde je vyhřívána na zvolenou teplotu. Vakuum vytvořené v prostoru s roztokem snižuje jeho bod varu a rotační pohyb baňky způsobuje intenzivní míchání odpařované směsi spojené se stálým obnovováním filmu kapaliny na vnitřním povrchu baňky. Tímto se zamezuje přehřívání kapaliny, zvyšuje se odpařovací povrch a zkracuje dráha bublin páry z vnitřního prostoru baňky na povrch roztoku. Důsledkem je intenzivní odpařování kapaliny, jejíž páry kondenzují ve vodním chladiči umístěném mezi zdrojem vakua a odpařovací baňkou a stékají do kondenzační baňky (Obr. 5).



Obr. 5: Schéma vakuové rotační odparky.

1 – odpařovací baňka; 2 – pohonná jednotka; 3 – vodní chladič; 4 – kondenzační baňka; 5 – napouštěcí uzávěr.

Stanovení bodu tání

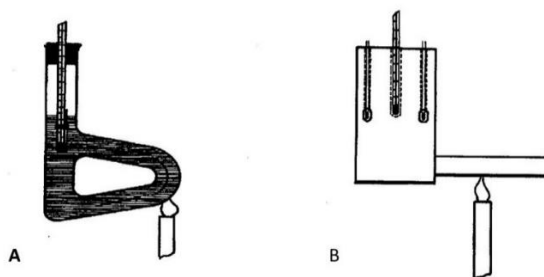
Bod tání je teplota, při níž je pevná látka v rovnováze se svou taveninou. Je to jedna ze základních fyzikálních veličin vedle bodu varu, hustoty, indexu lomu světla, optické aktivity apod. charakterizujících každou látku. Stanovení této veličiny a srovnání s tabelovanou hodnotou je zvláště pro organického chemika nejrychlejší metodou určení čistoty dané látky. Anorganické sloučeniny mají obvykle příliš vysoký bod tání. Čisté látky mají obvykle ostrý bod tání. Již nepatrné znečištění látky se projeví značným snížením bodu tání, a to i tehdy, jestliže nečistoty mají bod tání vyšší. Kromě snížení bodu tání je pozorovatelné zvětšení intervalu bodu tání. Tohoto jevu je využito ke zkoušení identity dvou látek s tímž bodem tání. Stejná množství obou látek se dokonale promísí a pak se stanoví bod

tání (tzv. směsný bod tání). Je-li nezměněn, jsou obě látky identické, je-li ve srovnání s bodem tání složek nižší, jde o různé látky. Mnohé látky se v okamžiku, kdy roztají, zároveň rozloží. Rozklad se obvykle projeví ztmavnutím nebo vývojem plynu. Bod rozkladu je zpravidla neostrý a závisí na rychlosti zahřívání.

Prakticky se bod tání stanovuje tak, že malý vzorek látky napěchovaný ve skleněné tenkostěnné kapiláře se umístí do lázně dobře vodící teplo, tj. do kapaliny nebo do kovového bloku, a pomalu se zahřívá tak, aby se podmínky co nejvíce blížily rovnovážným. Přitom se sleduje teplota lázně a pozoruje látka. Jako teplotu tání se pak označí teplota, při níž se objeví kapalná fáze.

Přístroje pro stanovení teploty tání právě popsaným postupem se nazývají **bodotávky**. Pro látky s teplotou tání nižší než 120 °C se používají skleněné bodotávky, což jsou skleněné nádoby, které bývají plněny kapalinou o vhodné tepelné kapacitě, např. silikonovým olejem, glycerolem apod. Vhodným tvarem nádoby se dosahuje toho, že při pozvolném zahřívání dochází k proudění kapaliny a současnému prohřívání vzorku a teploměru, na kterém je kapilára se vzorkem připevněna. Na Obr. 15A je skleněný P-bodotávek. U látek s vyšší teplotou tání se používají bodotávky kovové, tzv. Thieleho bloky. Jsou to bloky z kovu dobře vedoucího teplo, do kterých jsou vyvrtány svisle tři otvory (Obr. 15B). Do prostředního otvoru je vložen teploměr, do zbývajících otvorů kapiláry se vzorkem. U kovového bloku je pomalého zahřívání dosaženo tím, že není zahříván přímo blok, ale tyčka, kterou je blok zároveň upevněn do stojanu. Vzorek je pozorován v procházejícím světle lampičky upevněné na stojanu za vzorkem.

V laboratorní praxi se často používá speciálních zařízení určených pro práci v mikroměřítku. Jsou to v podstatě upravené mikroskopy s elektricky vyhříváným stolem, který je opatřen teploměrem. Na tento tzv. mikrovýhřevný stolek je položen vzorek v uspořádání běžném pro mikroskopování a během zahřívání se pozoruje v mikroskopu a očekává se stav, kdy se krystaly změní v rovnovážnou směs pevné a kapalné fáze.



Obr. 6: Bodotávky. A – Skleněný P-bodotávek; B – Thieleho kovový blok.

ÚKOL Č. 1: Izolace kofeinu z čaje a jeho přečištění sublimací

Alkaloidy jsou nejpočetnější skupinou rostlinných látek sekundárního metabolismu a dosud jich bylo izolováno kolem sedmi tisíc. Z chemického hlediska se dají alkaloidy popsat jako organická báze s jedním nebo několika heterocyklickými dusíkovými atomy v molekule, v přírodě se vyskytující ve

formě solí s organickými kyselinami. Alkaloidy obsahuje 10 až 20 % všech vyšších rostlin. Byly nalezeny ve všech jejich částech, ale nejvíce jsou přítomné v semenech, kořenech a kůře stromů.

Kofein patří do skupiny purinových alkaloidů (purin je složen ze dvou heterocyklů – pětičlenného a šestičlenného a obsahuje celkem 4 atomy dusíku na molekulu). Molekula kofeinu má navíc dvě oxo-skupiny (xanthin) a je třikrát methylovaná. Kofein je nejhojněji zastoupen v semenech kávovníku a kakaovníku a v listech čaje. Má povzbudivý účinek na centrální nervovou soustavu a srdeční činnost, podporuje činnost ledvin a zvyšuje tvorbu moči. Stimulační účinek kofeinu, stejně jako theofylinu z čaje, je založen na inhibici enzymu fosfodiesterasy, která odbourává látky přenášející nervový vzruch, jako je např. cyklický adenosinmonofosfát, tedy látka o podobné chemické struktuře.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Váženky	Odměrné válce
Lžičky/špachtle	Vakuová rotační odparka + vývěva
Předvážky	Vodní lázeň
Kádinky	Baňky + svorky
Skleněná tyčinka	Varné kuličky
Vaříč	Hadice
Filtrační papír	Mikrozkumavka
Nálevka	Lepicí páska + nůžky
Dělicí nálevka	Pinzeta
Stojany	Polystyrenový kruh
Filtrační kruhy	Odpařovací miska

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Čajové listy	Chloroform
Octan olovnatý	5% roztok hydroxidu sodného
Ethanol	

POSTUP:

1. Před začátkem práce zapněte vodní lázeň u vakuové rotační odparky a vodní lázeň v digestoři na odpařování vzorku, abyste během práce předešli časovým prodlevám.
2. Na předvážkách odvažte tři gramy čajového listí a povařte v kádince na vaříči 5 minut v 50 ml destilované vody.
3. Připravte 20 ml roztoku octanu olovnatého ($w/v = 5\%$), přilijte ho k čajovému odvaru, zamíchejte a povařte dalších 5 minut.
4. Poskládejte francouzský filtr a za tepla roztok přefiltrujte.
5. S použitím dělicí nálevky v digestoři proveďte extrakci filtrátu s 15 ml chloroformu vytřepáváním, třikrát po sobě.

Pozor na vnitřní přetlak, který je nutné průběžně uvolňovat otočením nálevky dnem vzhůru a otevřením ventilu. Před započatím extrakce upozorněte vyučujícího a zajistěte dostatečný přísun čerstvého vzduchu otevřením okna.

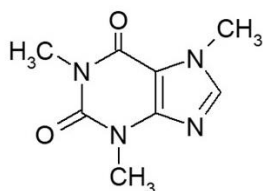
- Spojené extrakty v organickém rozpouštědle promyjte v dělicí nálevce destilovanou vodou (15 ml) a potom stejným objemem roztoku hydroxidu sodného (w/v = 5 %). Přečištěný chloroformový extrakt zahustěte na vakuové rotační odparce následujícím způsobem:
- Extrakt přelijte do 250ml baňky s kulatým dnem a zábrusovým hrdlem. Nezapomeňte vložit varné kuličky. Baňku připevněte svorkou na ústí vakuové odparky, pomocí šroubu umístěte baňku do polohy, kdy je její spodní stěna omývána vodou ve vodní lázni. K vakuové odparce připojte kondenzační baňku.
- Do chladiče pusťte mírným proudem vodu a zkontrolujte, zda je utěsněna kondenzační baňka. Spusťte vývěvu a evakuujte odparku, spusťte rotaci baňky.
- Po skončení odpařování vypněte vývěvu, odpařovací baňku narovnejte do vodorovné polohy, uvolněte svorku a odšroubujte přívod vakua k odparce. Poté opatrně sundejte odpařovací baňku. Odparek rozpusťte v ethanolu a baňku kvantitativně etanolem vypláchněte. Ethanolický roztok odpařte na vodní lázni.
- Připravte si aparaturu k sublimaci podle obrázku 13C, odparek převedte na dno kádinky aparatury. Rozhraní mezi chladičí baňkou a kádinkou utěsněte lepicí páskou.
- Aparaturu zahřívejte na vařiči až do doby, kdy ustane vývoj sublimujících par.
- Po skončení sublimace zastavte vodu a oddělte zátku s trubicemi. Krystalky kofeinu vyloučené na dně baňky se pokuste pomocí špachtle kvantitativně převést do předem zvážené mikrozkušavky.

VYHODNOCENÍ:

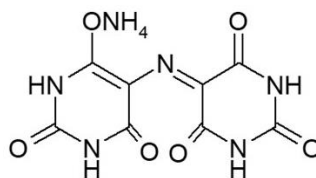
Uveďte výtěžek izolace kofeinu a navrhnete způsoby, jak byste určili jeho čistotu.

ÚKOL Č. 2: Analytický důkaz přítomnosti kofeinu

Kofein lze prokázat tzv. murexidovou reakcí. Jedná se o barevný test na kyselinu močovou a jiné puriny. Pevný vzorek je oxidován v kyselém prostředí, odpařen a následně po přidavku amonných iontů vzniká purpurové zbarvení náležející vznikajícímu murexidu (amonná sůl 5, 5'-nitridibarbiturové kyseliny).



kofein



murexid

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Hodinová skla o průměru 8-10 cm
Lihový kahan + sirky
Kleště
Ochranný štít/ochranné brýle

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

3% roztok peroxidu vodíku
Koncentrovaná kyselina chlorovodíková
Amoniak

POSTUP:

POUŽIJTE OCHRANNÉ BRÝLE NEBO ŠTÍT!!!

1. Provedte tzv. murexidovou reakci k prokázání přítomnosti kofeinu. Kontrolní reakci provedte rovněž s firemním preparátem kofeinu.
2. Na hodinové sklo se sublimátem a na sklo s firemním kofeinem kápněte 3 % roztok H_2O_2 a koncentrovanou HCl.
3. Roztok odpařte, misku nechte zchladnout na stole a přikápněte roztok čpavku.
4. Purpurové zbarvení prokáže přítomnost kofeinu.

VYHODNOCENÍ:

Uveďte, zda reakce na přítomnost kofeinu byly pozitivní a jak se odlišovalo zbarvení komerčního a vámi izolovaného kofeinu.

ÚKOL Č. 3: Stanovení teploty tání kofeinu

V této úloze ověříte čistotu vámi izolovaného kofeinu z čajového listí pomocí jedné z nejrychlejších a nejspolehlivějších metod. Teplotu bodu tání budete stanovovat pomocí moderního bodotávku, jehož princip je založen na Thieleho kovovém bloku. Bodotávek je ovládán elektronicky s digitálním výstupem. Lze na něm měřit současně dva vzorky, umístěné v kapilárách. Odečet se dělá vizuálně pomocí zvětšovacího okuláru.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Bodotávek
Kapiláry skleněné
Skleněná trubice

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Kofein komerční čistý
Kofein izolovaný ve cvičení

POSTUP:

1. Do kapilár dejte vzorek vámi izolovaného kofeinu a vzorek čistého kofeinu.
2. Otevřeným koncem kapiláry nahrňte malé množství suchého vzorku, zbytek kolem kapiláry otřete a kapiláru nechejte asi 5x volně padat svisle postavenou trubicí dlouhou asi 1,5 metru na tvrdou podložku. Vzorek látky se tak dobře napěchuje do malého objemu na dně kapiláry. Sloupeček by měl být vysoký asi 2 mm.
3. Zapněte bodotávek hlavním vypínačem. Kapiláry se vzorkem vložte do bodotávku a zkontrolujte, zda je vzorek dobře viditelný. Stiskněte tlačítko „plateau set“ a stiskem tlačítka šipky nahoru nastavte teplotu na 270 °C a stiskněte START. Teplota začíná narůstat a kolem aktuální teploty 200 °C pozorně sledujte oba vzorky.
4. Odečtěte teplotu, při které roztají vámi izolovaný kofein a kofein komerční.

VYHODNOCENÍ:

Porovnejte obě získané hodnoty bodu tání. Vyhledejte hodnotu bodu tání pro kofein a případné rozdíly vysvětlete.

6. Izolace nukleových kyselin

Úprava biologického materiálu

K biochemickým studiím se používá nejrůznější biologický materiál, který příroda poskytuje. Vzhledem k jeho různorodosti je technika zpracování mnohdy velmi odlišná a řídí se účelem, k jakým studiím má být použit. Způsob zpracování materiálů bývá často odlišný podle toho, zda má být výchozí surovinou pro izolaci, detekci nějaké sloučeniny či skupiny látek nebo zda se bude studovat jejich metabolismus.

Má-li být izolována nějaká látka nebo skupina látek z biologického materiálu (např. vitamín, bílkovina, sacharid apod.), je důležité zvolit vhodnou výchozí surovinu. Pro izolaci se hodí nejlépe takový biologický materiál, ve kterém je požadovaná látka v nejvyšší koncentraci, je dostupný a jeho cena přijatelná. Vybraný živočišný, rostlinný nebo mikrobiální materiál je třeba v prvním kroku homogenizovat. Rozrušení rostlinných a živočišných buněk nedělá obvykle potíže. Jinak však je tomu při izolacích z buněk mikroorganismů. Buněčná stěna mikroorganismů je velmi rezistentní a její narušení vyžaduje zvláštní postupy, viz níže.

Mletí

Suchý materiál může být rozemlet v různých typech mlýnků. Semena se melou v kulových mlýnech nebo mlýnech s otočnými noži. K mletí živočišných materiálů se velmi dobře hodí mlýnek na maso. Tkáň se v něm řeže a drtí zároveň. Hrubost nebo jemnost lze regulovat vložením vhodné destičky, kterou se rozemletý materiál protlačuje. Všechny uvedené strojky a mlýnky většinou může nahradit běžný univerzální kuchyňský robot, který je vybaven mixérem, mlýnkem, masovým strojkem i struhadly.

Rostlinný materiál určený ke studiu exprese genů, obsahu fytohormonů aj. je třeba během mletí neustále chladit, aby nedocházelo k degradaci. Provádí se tak chlazením tekutým dusíkem. Rostlinný materiál se může drtit pomocí třecí misky s tloučkem, přičemž všechny potřeby, které přichází do styku s rostlinným materiálem, musí být taktéž vychlazeny. Další možností nadrcení rostlinného materiálu je použití tzv. kuličkového mlýnku.

Homogenizace

Na rozdíl od mletí nasucho je v biochemické práci chápána homogenizace jako důkladné rozmělnění materiálu za přídavku vody nebo vhodných pufrů či fyziologických roztoků.

Pro homogenizaci malých množství je nejvhodnější roztírání materiálu v třecí misce za přídavku mořského písku, skelného prachu nebo jiného abraziva. Tužší materiály se před homogenizací zmrazí kapalným dusíkem, který je učiní křehčími k rozmělnění. Homogenizaci lze rovněž provést ve výkonném mixéru.

K narušení buněčné stěny a membrány mikroorganismů, tzv. desintegraci, se používá ještě některých speciálních metod. Např. působení chemických činidel (detergenty), působení enzymů štěpících polysacharidy buněčných stěn (lysozym, celulasa), krátké působení ultrazvuku, opakované zmrazování a rozmrazování. Přehled nejužívanějších homogenizačních technik je uveden v tabulce 2.

Tab. 2: Přehled nejpoužívanějších homogenizačních technik.

METODA	PŘÍKLAD POUŽITÍ	PRINCIP
Šetrné		
lýze buněk	erythrocyty	porušení buněčné membrány osmotickým tlakem
působení enzymů	bakterie	štěpení buněčné stěny specifickými enzymy
působení chemikálií	extrakce kvasinek organickými rozpouštědly nebo vhodnými kyselinami	částečná solubilizace buněčné stěny
homogenizace	jaterní tkáň	mechanické porušení buněk protlačováním úzkou štěrbinou
mletí	svalová tkáň, semena	působení střížných sil, mechanické porušení tkáně
Střední		
mixování v nožových mixérech	živočišná a rostlinná pletiva	působení střížných sil
mletí s abrazivy	rostlinné tkáně, bakterie	mechanické porušení buněk
Intenzivní		
ultrazvuk	buněčné suspenze	náhlé změny tlaku a teploty při zániku vznikajících mikrobublin
kuličkový mlýn	buněčné suspenze	mechanické porušení buněk rychlou vibrací skleněných kuliček
French press	kvasinky	dezintegrace buněčné stěny vysokým tlakem

Centrifugace

Centrifugace čili odstředování patří k nejběžnějším operacím v biochemické laboratoři. Dovoluje oddělit složky suspenze nebo emulze na základě rozdílných hustot. Bývá často rychlejší a pohodlnější než filtrace a v některých případech vede i k lepšímu oddělení pevné a kapalné fáze. Kromě nahrazení nebo doplnění filtrace, zvláště je-li suspendovaná látka velmi jemná, špatně filtrovatelná a filtrace zdoluhavá, má odstředování v biochemii i jiný význam. Slouží k některým speciálním preparativním a analytickým účelům (např. izolace mitochondrií diferenční centrifugací). Dále je to příprava buněčných struktur gradientovou centrifugací a z analytických aplikací pak především stanovení relativních molekulových hmotností sloučenin a stanovení čistoty izolovaných preparátů.

Při odstředování působí na sedimentující částice odstředivá síla (P), kterou lze vyjádřit vztahem:

$$P = m \cdot r \cdot \omega^2,$$

kde: m ... hmotnost částice,
 r ... poloměr otáčení,
 ω ... úhlová rychlost.

Pro praktické výpočty se však zavádí veličina relativní odstředivé zrychlení R , které udává, kolikrát je toto zrychlení větší než zemské tíhové zrychlení g a je dána vztahem:

$$R = 1,118 \cdot r \cdot N^2 \cdot 10^{-5},$$

kde: N ... počet otáček za minutu,
 r ... poloměr otáčení v cm.

Je nutno ji uvádět jako hlavní charakteristiku centrifugace. Z prvního vztahu je zřejmé, že pouhý údaj počtu otáček za minutu necharakterizuje proces centrifugace.

Během nastavování centrifugy je třeba brát zřetel na to, kterou jednotku zadáváme – zda násobky zrychlení ($x g$) či otáčky za minutu (RPM). Tyto dvě hodnoty nejsou stejné, ale existuje mezi nimi vztah. Dříve byl ke každé centrifuze dodáván nomogram k převodu těchto jednotek mezi sebou díky znalosti poloměru rotoru. Dnešní centrifugy toto již zvládají díky elektronice samy.

Existuje celá řada typů centrifug, které se liší velikostí (od malých stolních až po velkoobjemové průmyslové odstředivky), dosahovaným zrychlením a tvarem rotorů (výkyvné a úhlové). Ve výkyvných rotorech jsou kyvety uloženy v pouzdrech, která jsou volně zavěšena v čepech vlastního rotoru a kyvety jsou během odstředování ve vodorovné poloze. Naproti tomu v úhlových rotorech jsou kyvety fixovány v určitém úhlu ($45 - 50^\circ$) k ose otáčení.

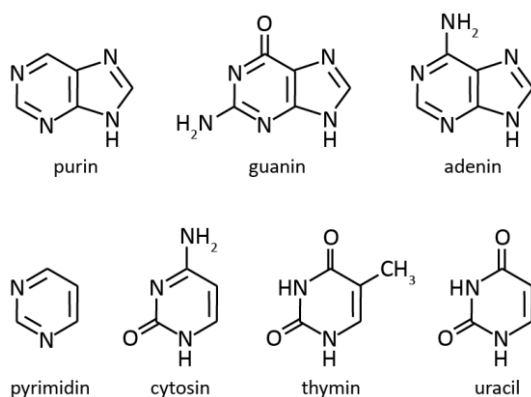
Zvláštní kategorii tvoří ultracentrifugy, na nichž lze dosáhnout relativního odstředivého zrychlení $100\,000 \times g$ a více. Liší se od běžných centrifug zejména tím, že prostor s rotorem musí být při odstředování evakuován, snižuje se tím tření způsobené přítomností vzduchu, díky tomu se rotor nebude zahřívat. Používají se pro dělení biopolymerů a subcelulárních částic v hustotním gradientu sacharosy nebo cesných solí. Tyto techniky lze provádět jak v analytickém, tak i v preparativním měřítku. Analytické centrifugy jsou navíc opatřeny optickým zařízením umožňujícím sledovat rozhraní tvořená jednotlivými sedimentujícími látkami.

Pro většinu prací preparačních i analytických jsou požadovány centrifugy chlazené. Chlazení centrifug je zajišťováno chladicími agregáty, zabudovanými do jediného provozního celku s centrifugou a je ovládáno termostatem. **Protilehlé kyvety (u vysokootáčkových centrifug všechny kyvety) musejí být staticky a dynamicky vyváženy. Z bezpečnostních důvodů i z hlediska ochrany centrifugy je nutno klást na vyvažování kyvet zvýšenou pozornost. Každá nepřesnost v dynamickém i statickém vyvážení se mnohonásobně projeví zvětšením odstředivého tlaku na jednu stranu osy. Osa se nerovnovázným zatížením snadno ohne nebo se poškodí ložisko.** Při chodu odstředivky se při nepřesném vyvážení projevují silné vibrace. Statického vyvážení se dosáhne tak, že se na technických váhách s přesností na jeden gram vyváží protilehlá pouzdra s kyvetami naplněnými suspenzí určenou k centrifugaci. Daleko větší pozornost je třeba klást dynamickému vyvážení protilehlých kyvet. Protilehlé kyvety musí mít stejnou velikost, hmotnost a stejně umístěné těžiště. To znamená, že protilehlé kyvety musí být naplněny stejnou suspenzí, přesněji řečeno suspenzí o stejné hustotě. Nelze tedy například při precipitaci síranem amonným kyvetu s tímto roztokem vyvážit kyvetou s destilovanou vodou.

Nukleové kyseliny

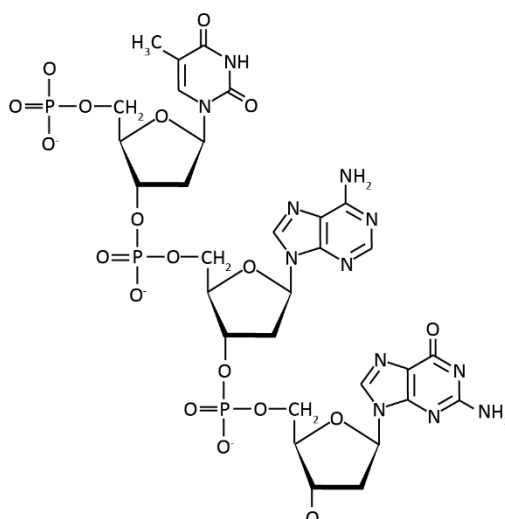
Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky, které ve své struktuře nesou genetickou informaci. Běžnými nukleovými kyselinami jsou kyselina deoxyribonukleová (DNA) a ribonukleová (RNA). Základní stavební jednotkou nukleových kyselin je tzv. nukleotid. Nukleotid je obecně heterocyklická báze, která N-glykosidickou vazbou váže sacharid (pentosu) a esterovou vazbou fosfát (odtud kyselina). Heterocyklické báze v nukleových kyselinách jsou purinové nebo pyrimidinové povahy. Nejčastěji zastoupené pyrimidinové báze jsou cytosin (C), thymin (T) a uracil (U), a purinové báze adenin (A) a guanin (G) (Obr. 1). Zatímco DNA obsahuje báze C, T, A, G, u RNA je T zaměněn za U.

Jak už z názvu vyplývá, nukleotidy RNA v sobě vážou sacharid ribosu, kdežto DNA její 2-deoxy variantu. Jednotlivé nukleotidy jsou vázány do polynukleotidového řetězce skrze fosfát (Obr. 2), jedná se tedy o vazbu diesterovou.

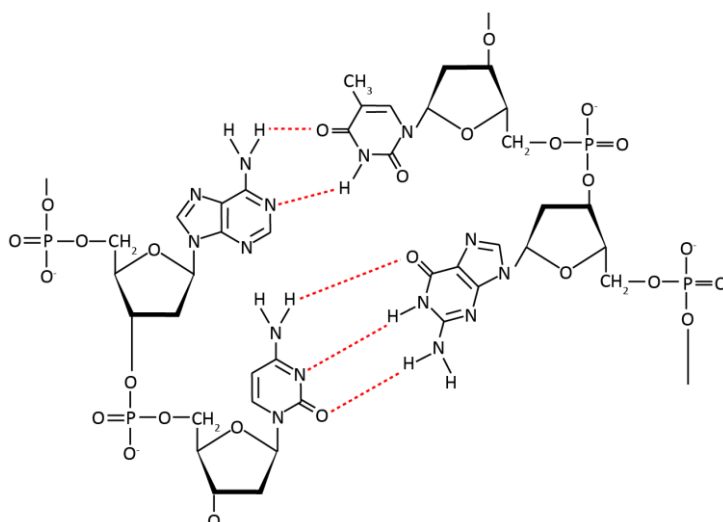


Obr. 1: Purinové a pyrimidinové nukleotidy.

Nukleové kyseliny byly objeveny již roku 1869 v buněčných jádrech. Jejich strukturu však odhalili až v roce 1953 párové Watson a Crick (Nobelova cena), kdy bylo rozluštěno vzájemné párování nukleotidů dvou na sebe antiparalelních řetězců dvoušroubovice DNA (Obr. 3).



Obr. 2: Nukleotidy spojené v řetězec (UAG).



Obr. 3: Párování bází ve dvoušroubovici DNA.

Izolace nukleových kyselin

Pro izolaci nukleových kyselin z živých organismů byla vyvinuta řada metod, které se od sebe mohou dosti odlišovat. Pro stručnost tohoto textu budou popsány dvě základní.

Prvním krokem u všech metod je vždy lýze buněk, nebo pevné tkáně. U buněk většinou stačí rozrušit buněčnou stěnu a membrány, nejčastěji se za tímto účelem používají detergenty, jako je dodecylsulfát sodný (SDS) nebo Triton X-100. Pro izolaci DNA nebo RNA z rostlinných pletiv nebo živočišných tkání je třeba nejdříve mechanického narušení, které provádíme buď mrazem – tekutým dusíkem nebo různými typy homogenizátorů. Buněčný obsah včetně DNA se z lyzovaných buněk uvolní do extrakčního pufu, který vždy musí obsahovat chelatační činidlo ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA), která vychtá veškeré vápenaté ionty z extraktu. Vápenaté ionty fungují jako kofaktory

nukleas, enzymů které štěpí nukleové kyseliny, a pokud by tyto enzymy byly během extrakce aktivní, naštěpily by veškeré izolované nukleové kyseliny. Do extrakčního pufru se někdy přidávají navíc ještě proteinasy, enzymy štěpící proteiny. Většina DNA je totiž obalená histony a jejich odstranění proteinasou zvýší čistotu izolované DNA.

Jeden typ metod je založen na extrakci směsí fenolu a chloroformu. Fenol se rozpouští ve vodě i v chloroformu, preferuje ale chloroform. Chloroform se jako organické rozpouštědlo s vodou nemísí. Přidáme-li tedy směs fenolu a chloroformu k extraktu ze živé tkáně, veškeré tuky přecházejí do chloroformu, bílkoviny a část polysacharidů se působením organických rozpouštědel vysráží a nukleové kyseliny zůstanou ve vodné fázi. Po intenzivní extrakci se směs zcentrifuguje a vzniklé fáze se od sebe oddělí. Vysrážené proteiny a sacharidy vytvoří na rozhraní bílou prstencovitou sraženinu. Pro vysrážení nukleových kyselin z vodné fáze se používá absolutní ethanol s přísadkou soli nebo isopropanol. Po intenzivní centrifugaci (14.000 RPM) pak nukleová kyselina vytvoří ve zkumavce opaleskující pelet, který se ještě promývá etanolem, suší a nakonec rozpouští ve vodě nebo vhodném pufru.

Novější metody využívají adsorpce nukleových kyselin na silikát v přítomnosti chaotropních solí, jako je třeba guanidin thiokyanát. Extrakt nukleových kyselin se smíchá se silikátovou matricí v podobě vrstvy silikátových kuliček v přítomnosti chaotropní soli. Nukleové kyseliny se naváží na kuličky a ty se pak promýváním zbaví kontaminujících proteinů, polysacharidů a jiných nečistot. Nakonec se nukleové kyseliny z kuliček uvolní snížením iontové síly roztoku. Tato metoda je velice rychlá a efektivní a využívá se ve většině komerčních setů pro izolaci nukleových kyselin např. v diagnostických laboratořích v nemocnicích.

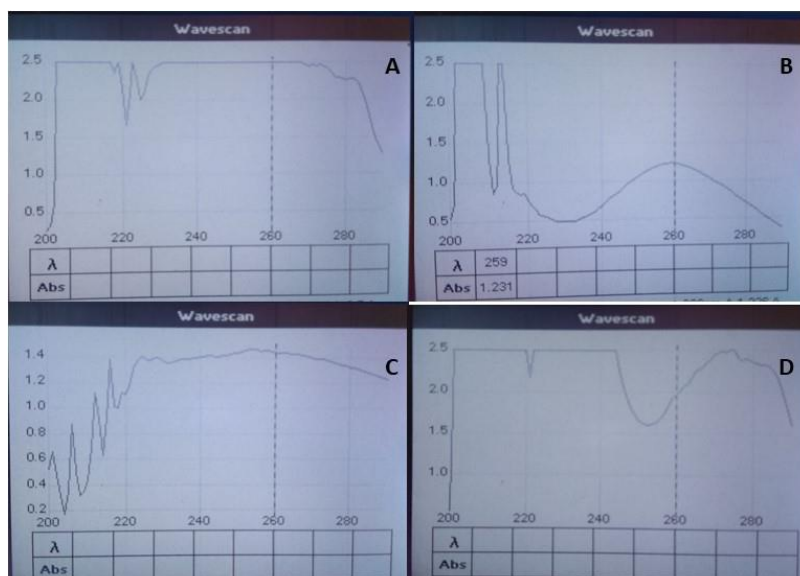
Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin

Jako důkaz přítomnosti izolované DNA i kontrolu její čistoty se používá nejčastěji spektrofotometrie v blízké UV oblasti. Nukleové kyseliny absorbují nejintenzivněji světlo o vlnové délce 260 nm, takže hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci DNA. Při stanovení je nutné dbát na čistotu preparátu, protože ruší přítomnost proteinů (280 nm) a aromatických látek. Pokud je DNA preparát čistý, poměr A_{260}/A_{280} dosahuje hodnoty 1,8.

$$c_{\text{DNA}} = 62,9 \cdot A_{260} - 36,0 \cdot A_{280} \quad [\text{ng}/\mu\text{l}]$$

Daleko citlivější stanovení koncentrace DNA je pomocí metody fluorimetrie, kdy je měřena fluorescence DNA po smísení se specifickým interkalačním barvivem, tedy barvivem, které se vmezeřuje mezi báze DNA.

Pro měření v UV oblasti je třeba používat kyvety, které jsou pro tuto oblast spektra určené – obvykle se jedná o kyvety křemenné či jinak upravené. Při použití plastové či obyčejné skleněné kyvety dochází k absorpci UV záření materiálem kyvety, tudíž jím paprsek neprojde a nelze stanovit absorbanci měřeného vzorku (Obr. 4A). Při použití UV kyvety uvidíte hladký průběh spektra (Obr. 4B). Dále je třeba dávat pozor na směr, kterým kyvetu do spektrofotometru vkládáte. Při špatném vložení kyvety opět nelze stanovit absorbanci měřeného vzorku (Obr. 4C).



Obr. 4: UV spektra stejného vzorku DNA. A – použití nevhodné plastové kyvety; B – použití UV kyvety; C – UV kyveta vložená špatným směrem; D – vzorek DNA s vysokou koncentrací kontaminujících proteinů. Na obrázku B je vidět absorpční maximum DNA při 260 nm.

ÚKOL Č. 1: Izolace DNA z vepřové sleziny a RNA z pekařských kvasnic

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Třecí misky s tloučkem
 Odměrné válce
 pH papírky
 Skleněná tyčinka
 Centrifugační kyvety
 Kádinky

Dřevěné prkénko a nůž
 Skleněné zkumavky
 Varné baňky
 Špejle
 Chlazená centrifuga
 Automatické pipety a špičky

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Vepřová slezina
 Pekařské kvasnice
 Hydroxid sodný
 Chlorid sodný

Kyselina octová
 Diethylether
 Ethanol
 Mořský písek

ROZTOKY:

5% kyselina octová
 50% kyselina octová

0,5% hydroxid sodný
 1 M chlorid sodný

POJMY:

- Precipitát, pelet – pevná, usazená část po centrifugaci
- Supernatant – čirá kapalina nad precipitátem

POSTUP:

IZOLACE RNA Z KVASNIC

Pozor, s diethyletherem pracujte v digestoři!!!

1. Do třecí misky nadrobte jedno balení pekařských kvasnic, přidejte lžičku mořského písku a důkladně rozetřete. Poté postupně přidejte 3 ml destilované vody a 3 ml diethyletheru. Po přidavku vždy důkladně rozetřete.
2. Do homogenátu postupně přidejte 50 ml 0,5% NaOH a pokračujte v roztírání asi ještě 15 min. Upravte pH pomocí 5% kyseliny octové na pH 6 (použijte pH papírky).
3. Směs rozdělte do 4 centrifugačních kyvet. Dbejte na správné vyvážení kyvet!
4. Směs centrifugujte při 9500 g a teplotě 4 °C po dobu 10 min.
5. Supernatant odlijte do kádinky a upravte na pH 3,5 pomocí 50% kyseliny octové – odměřte použité množství. Přidejte vychlazený ethanol – stejný objem jako kyseliny octové - vyloučená sraženina představuje ribonukleoprotein.
6. Sraženinu ribonukleoproteinů zcentrifugujte při 2000 g, 4 °C, 10 min. Supernatant téměř celý odlijte. Ribonukleoprotein rozmíchejte ve zbytku supernatantu a následně rozdělte do tří frakcí (největší množství do varné baňky, menší množství do velké zkumavky a nejméně do malé zkumavky) a uchovejte při 4 °C pro další experimenty.

IZOLACE DNA ZE SLEZINY

1. Slezinu z balíčku nakrájejte a následně v třecí misce rozetřete s trochou mořského písku na jemnou kaši.
2. Přidejte 100 ml vychlazeného 1 M NaCl - postupně po malých dávkách a za stálého roztírání. Homogenizujte 15 min.
3. Homogenát rozdělte do 4 centrifugačních kyvet. Dbejte na správné vyvážení kyvet!
4. Homogenát centrifugujte při 5000 g, 10 min, 4 °C. Mezitím si připravte 600 ml vychlazené destilované vody do 1 l kádinky.
5. Supernatant pomalu v tenkém proudu kontinuálně nalijte do vychlazené destilované vody, poté velmi jemně promíchejte pomocí dřevěné špejle. DNA se sráží ve formě opaleskujících vláken.
6. Za použití dřevěné špejle navíjejte vlákna DNA a ty přenášejte do varné baňky, do velké a malé zkumavky a uchovejte při 4 °C pro spektrální stanovení koncentrace DNA.

ÚKOL Č. 2: Důkaz nukleových kyselin

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Vodní lázeň

Vařič

Zpětný chladič

Stojany

Svorčky

Varné kamínky

Odměrný válec (50 ml)

Skleněné zkumavky

Špachtle

Automatické pipety a špičky

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Hydroxid sodný
Kyselina sírová
Uhličitan sodný
Kyselina chlorovodíková

Dusičnan stříbrný
Koncentrovaný amoniak
Folinovo činidlo
Difenylamin

ROZTOKY:

5% kyselina sírová
0,5% hydroxid sodný
Difenylaminové činidlo
5% dusičnan stříbrný

POSTUP:

ODLIŠENÍ DNA A RNA

DNA a RNA lze odlišit podle vázaného sacharidu na základě barevných reakcí, které poskytují ribosa a 2-deoxyribosa s difenylaminem. Zatímco RNA poskytuje s difenylaminem zelené zbarvení, DNA reaguje modře.

Pozor, pracujete s difenylaminem, pracujte v rukavicích a v digestoři!

- 1) K frakcím RNA a DNA ve větších zkumavkách přidejte 1 ml 0,5% NaOH a po promíchání a rozpuštění přidejte 1 ml difenylaminového činidla.
- 2) Reakce inkubujte na vroucí vodní lázni minimálně 20 min, pak pozorujte vývoj zbarvení.

STABILITA NUKLEOVÝCH KYSELIN

Hlavní úlohou DNA je uchovat genetickou informaci, což je zabezpečeno mimo jiné vysokou stabilitou fosfodiesterové vazby. Zatímco v alkalickém prostředí se DNA jen denaturuje, RNA se rozštěpí až na jednotlivé nukleotidy. Kyselou hydrolýzou se štěpí obě nukleové kyseliny, ale rozdílným způsobem.

- 1) K frakcím DNA a RNA ve varných baňkách přidejte 30 ml 5% kyseliny sírové a pod zpětným chladičem povařte 30 min. Nezapomeňte do baňky vložit varné kamínky!
- 2) Získané hydrolyzáty rozdělte po 1 ml do zkumavek (3 zkumavky pro DNA, 3 zkumavky pro RNA) a použijte pro další analýzy.

DŮKAZ PURINOVÝCH BÁZÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN

Purinové báze tvoří nerozpustné soli stříbrné a měďné.

- 1) K prvním dvěma zkumavkám s 1 ml hydrolyzátu RNA a DNA (z předchozího pokusu) přidávejte po kapkách amoniak až do alkalické reakce (detekujte pH papírkem) a 0,5 ml 5% roztoku AgNO_3 , pozorujte vznik jemné bílé vločkovité sraženiny.
- 2) Další dvě zkumavky s 1 ml hydrolyzátu RNA a DNA přiveďte k varu a přidejte 1 ml 10% CuSO_4 , poté postupně přidávejte pevný Na_2SO_3 , až dokud nevznikne tmavě žlutohnědá sraženina.

Guanin redukuje Folinovo činidlo za vzniku modrého zbarvení.

- 3) Ke třetím zkumavkám s 1 ml hydrolyzátu RNA a DNA přidejte 1 ml Folinova činidla, promíchejte a po špetkách přidávejte na nakloněnou stěnu zkumavky pevný Na_2CO_3 . Vzniká intenzivně modré zbarvení.

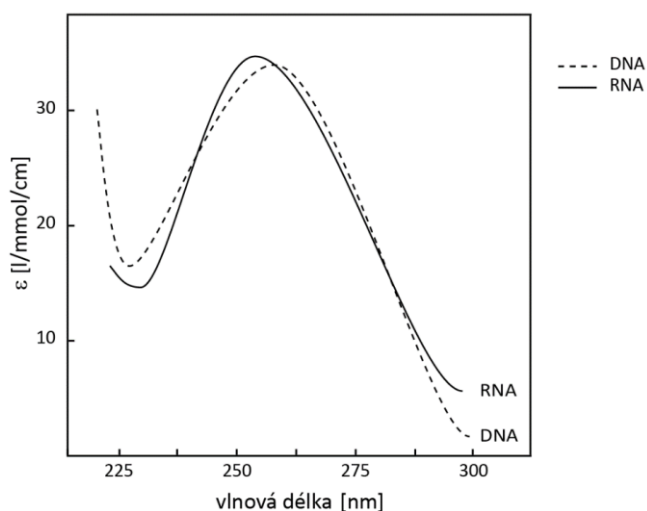
ÚKOL Č. 3: Spektrální stanovení koncentrace nukleových kyselin

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Křemenná kyveta
 Stolní spektrofotometr
 Automatické pipety a špičky
 Izolovaná DNA a RNA

POSTUP:

- 1) K RNA a DNA v malých zkumavkách přidejte 0,5 ml 0,5% NaOH.
- 2) Do 1 cm křemenné kyvety napipetujte 2 ml 0,5% NaOH a přidejte 20 μl alkalického roztoku DNA nebo RNA. Jako slepou reakci použijte 0,5% NaOH.
- 3) Proměřte absorpční spektrum v UV oblasti v rozsahu 200-290 nm. Pomocí šipek na spektrofotometru odečtěte hodnoty A_{260} a A_{280} . Spektrum si vyfotěte.



Obr. 5: UV-spektrum DNA a RNA.

VYHODNOCENÍ:

1. Pomocí výše uvedeného vzorce určete koncentraci a čistotu vámi izolovaných vzorků DNA. Vysvětlete, co může být příčinou, pokud je hodnota čistoty vyšší nebo nižší, než 1,8.
2. Do protokolu zaznamenejte pozorované spektrum pro DNA i RNA.
3. Zhodnoťte výsledek důkazových reakcí.

7. Destilace

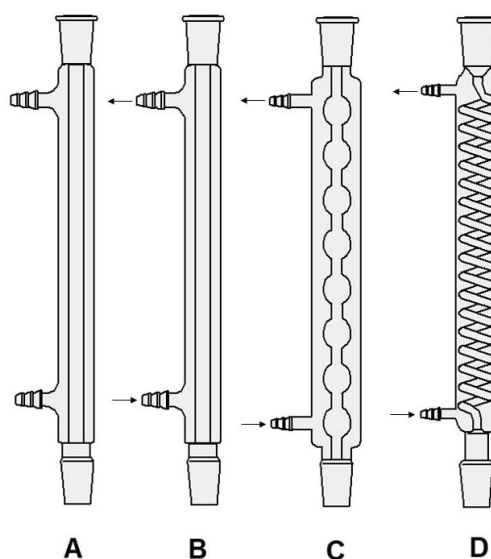
Destilace je metoda užívaná k dělení a čištění směsi kapalin, které se navzájem liší bodem varu. Všeobecně platí, že těkavější složky směsi přecházejí v páry snadněji než složky méně těkavé. Plynná fáze vyskytující se nad kapalinou má tedy jiné složení než kapalná směs a **destilát** (kondenzát) vzniklý kondenzací těchto par bude bohatší na těkavější složku.

Chceme-li dosáhnout **dokonalého rozdělení směsi** dvou kapalin jedinou destilací v jednoduché aparatuře, musí se jejich body varu lišit alespoň o **50 °C** a destilované látky nesmějí vytvářet **azeotropní směs (azeotrop)**. Azeotrop lze definovat jako směs s konstantním bodem varu, jejíž složky od sebe nelze oddělit jednoduchou destilací. Dle povahy kapalně směsi je třeba volit vhodnou destilační metodu pro oddělení složek směsi.

Je-li kapalina znečištěna pouze malým množstvím těkavých látek, pak je možné ji čistit **jednoduchou destilací** nebo pouhým odpařováním. Jedná-li se však o směs látek s velmi blízkými body varu, pak je třeba použít tzv. **frakční destilaci** (neboli **rektifikaci**). Je-li destilovaná látka termicky málo stabilní a rozkládá se při nižší teplotě, než je její bod varu, pak je nutné použít **destilaci vakuovou**. Vakuová

destilace probíhá za sníženého tlaku, kterého lze dosáhnout pomocí vakuové pumpy. Často využívaným zařízením pro vakuovou destilaci je **vakuová rotační odparka**. Destilace s vodní parou se používá k oddělení těch látek, které těkají s vodní parou při nižší teplotě, než je jejich bod varu.

Pro účely opětovného zkapalnění par destilované kapaliny se v laboratorních podmínkách používají chladiče, u kterých se rozlišuje několik druhů. Páry vysokovroucích látek (s bodem varu nad 150 °C) kondenzují ve **vzdušném chladiči** (Obr. 1A), v ostatních případech se používá **Liebigův chladič**, kterým protéká studená voda (Obr. 1B). Ještě účinnější je **chladič kuličkový** (Obr. 1C) nebo **spirálový** (Obr. 1D), který se při sestavování destilační aparatury musí postavit do šikmé polohy tak, aby se v něm nezdržoval kondenzát. Variace spirálového chladiče je rovněž často využívána u vakuové rotační odparky.



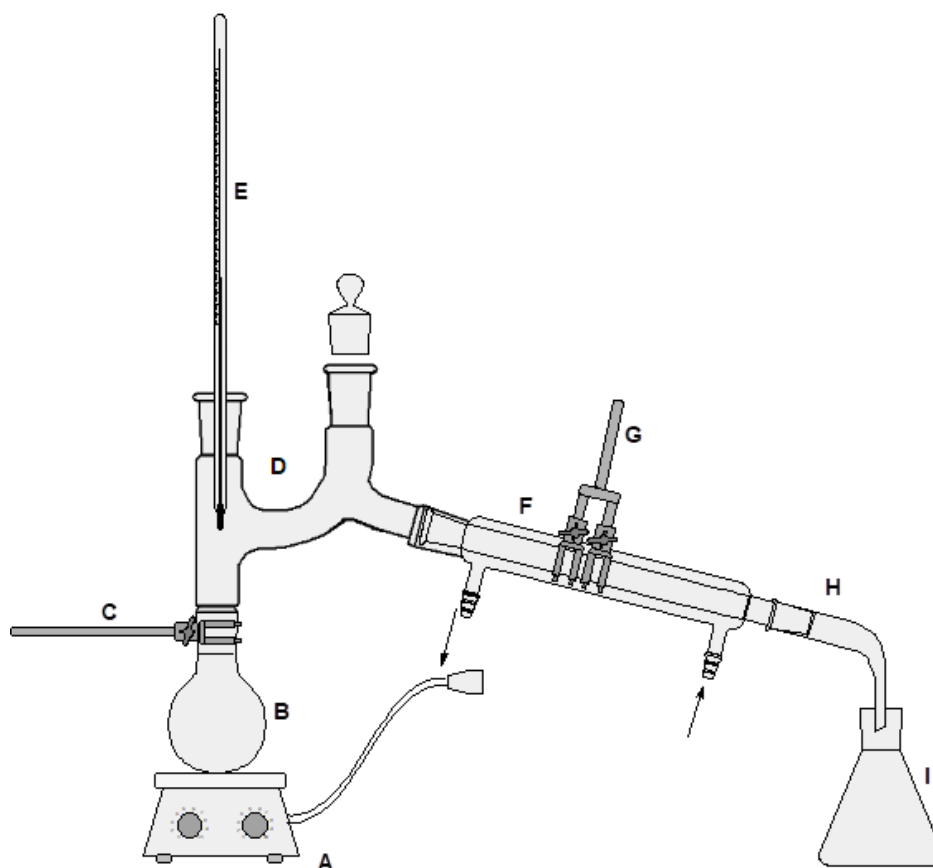
Obr. 1: Chladiče. A – vzdušný chladič; B – Liebigův chladič; C – kuličkový chladič; D – spirálový chladič. Šipky naznačují směr toku chladicího média (vody).

Destilace za normálního tlaku

Destilace za normálního tlaku je nejběžnější druh destilace a používá se všude tam, kde kapalina přechází snadno v páry při teplotě, za které se není třeba obávat rozkladu destilované látky. **Destilační aparatura** (Obr. 2) se skládá z varné baňky, případně z baňky frakční. Varná baňka se nevolí příliš velká a plní se maximálně do 3/4 objemu. Baňka se uzavírá přes Claisenův nástavec, na který je napojen teploměr pro měření teploty a chladič pro kondenzaci par.

Jelikož má při destilaci směsi vroucí kapalina obvykle vyšší bod varu než kondenzát, je vhodnější neponořovat teploměr do kapaliny, nýbrž odečítat teplotu odváděných par. Na konci chladiče je obvykle upevněna **alonž**, pomocí níž stéká kondenzát do jímací nádoby (**předloha** neboli **kondenzační baňka**). Velice výhodné jsou aparatury zábrusové, obzvláště při práci s agresivními látkami.

V dokonale hladkých nádobách může při zahřívání kapalin dojít k tzv. **utajenému varu**. Je to metastabilní stav, který vznikne přehřátím kapaliny o několik stupňů nad její bod varu. Náhodný impuls pak vyvolává prudký var, vzkypění a přetečení destilované směsi do předlohy. Aby se zabránilo vzniku utajeného varu, vkládají se do varné baňky tzv. varná tělíska (skleněné kuličky, úlomky polévaného porcelánu, drcená cihla, varné kamínky apod.).



Obr. 2: Destilační aparatura za normálního tlaku. A – vaříč; B – varná baňka; C – laboratorní držák; D – Claisenův nástavec; E – teploměr; F – Liebigův chladič; G – laboratorní držák pro chladič; H – alonž; I – Erlenmayerova baňka.

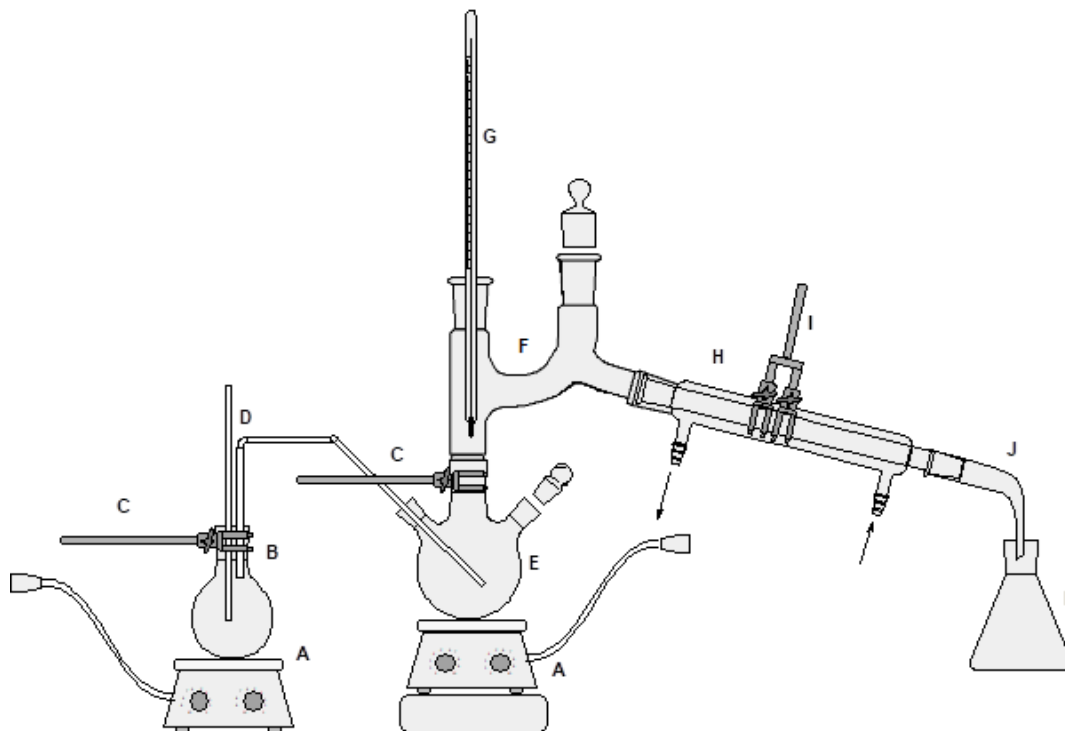
Destilace s vodní párou

Podle **Daltonova zákona** je tlak nad směsí dvou nebo několika kapalin roven součtu parciálních tlaků jednotlivých složek. Jelikož var kapaliny nastane v okamžiku, kdy se tenze její páry rovná okolnímu – atmosférickému tlaku, je zřejmé, že bod varu takové směsi bude nižší než body varu jednotlivých oddělených složek.

Jako příklad lze pro jednoduchost uvést směs anilinu a vody, která vře při 98 °C, kdy tenze vodní páry činí $9,42 \cdot 10^4$ Pa a tlak par anilinu je $7,07 \cdot 10^3$ Pa. Bod varu samotného anilinu je roven 184,4 °C. Destilace s vodní parou je tedy založena na využití Daltonova zákona. Používá se hlavně v organické chemii. Tímto způsobem je možno předestilovat látky, které mají bod varu i vyšší než 200 °C při teplotách nižších než 100 °C a uchránit je tak před nežádoucím rozkladem.

Při destilaci s vodní parou se používají aparatury sestavené dle obrázku 3. Aparatura se skládá z vyvíječe vodní páry, kterým je varná baňka uzavřená 2x vrtanou zátkou. Jedním otvorem prochází dlouhá skleněná trubice sahající až ke dnu nádoby. Je to tzv. **pojistná trubice** a jejím úkolem je zabránit při náhlém poklesu tlaku ve vyvíječi nasátí kapaliny z destilační baňky. Podtlak se vyrovná nasátím vzduchu pojistnou trubicí. Baňky i chladič jsou uchyceny pomocí laboratorních držáků a laboratorních spojek do laboratorních stojanů, pro zajištění stability celé aparatury.

Vodní pára probublává destilační baňkou, která je zahřívána souběžně s vyvíječem vodní páry. Destilační baňka je většinou upevněna vzhledem k ostatní aparatuře do šikmé polohy proto, aby kapalina, rozstříkovaná proudem vodní páry, nevnikla do chladiče a neznečistovala tak kondenzát. Další možností prevence znečištění kondenzátu je použití Claisenova nástavce, který zvětšuje vzdálenost mezi kapalinou a ústím chladiče. Chladič bývá standardně zakončen alonží a jímací nádobou.

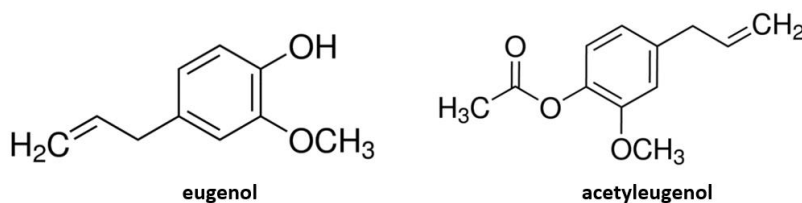


Obr. 3: Destilace s vodní parou. A – vařič nebo topné hnízdo; B – varná baňka; C – laboratorní držák; D – pojistná trubice a trubice pro vedení vodní páry; E – trojhrdlá baňka; F – Claisenův nástavec; G – teploměr; H – Liebigův chladič; I – laboratorní držák pro chladič; J – alonž; K – Erlenmayerova baňka.

ÚKOL Č. 1: Izolace hřebíčkové silice z hřebíčku destilací s vodní parou

V tomto cvičení lze izolovat silice z dalších volitelných zdrojů (levandule, kmín apod.), teoretická příprava je zde hodnocena 20 kladnými body.

Hřebíčková silice je homogenní směs o složení eugenol (85-90 %), acetyleneugenol (9-10 %) a malé množství jiných látek. Látky přítomné v této směsi mají teploty varu 254 °C pro eugenol a 281-286 °C pro acetyleneugenol. Obě tyto látky jsou ve vodě pouze velmi málo rozpustné. Hustota těchto látek se pohybuje v rozmezí 1,079 g·ml⁻¹ pro acetyleneugenol a 1,067 g·ml⁻¹ pro eugenol při 25°C.



Při teplotě varu vody však obě tyto látky mají značnou tenzi par a lze je proto z hřebíčku snadno vydestilovat s vodní parou při teplotě nižší než 100 °C. Ze získané vodní emulze se silice vyextrahuje do vhodného rozpouštědla. Následným oddestilováním rozpouštědla z extraktu je docíleno jeho zahuštění. Tímto postupem lze získat čistou hřebíčkovou silici skládající se převážně z eugenolu a acetyleugenolu.

Eugenol je fenolická látka obsažená hlavně v nezralých plodech rostlin čeledi *Myrtaceae* jako je *Pimento officinalis* či *Caryophyllum aromaticum* u nás známých jako nové koření (jamajský pepř) a hřebíček. Z pohledu chemického se jedná o derivát guajakolu s allylovým řetězcem, který náleží mezi fenylypropanoidy. Vzhledem se jedná o bezbarvou až bledě žlutou olejovitou kapalinu příjemné, hřebíčkové vůně. V současné době se používá v zubním lékařství jako lokální anestetikum a rovněž působí jako aktivátor žaludečních trávicích enzymů a s tím také souvisí obliba těchto druhů koření téměř ve všech světových kuchyních.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Alonž (velká a malá)	Liebigův chladič (velký a malý)
Claisenův nástavec (velký a malý)	Mikrozkumavka
Dělicí nálevka se skleněnou zátkou (250 ml)	Odměrný válec (25 ml)
Erlenmayerovy baňky (100 ml)	Pasteurova pipeta
Filtrační kruh střední	Skleněné zátky 14/15
Gumové hadice	Skleněné kuličky/varné kamínky
Hrnc pro vodní lázeň	Teploměr do 150°C
Kádinky (50 ml, 100 ml, 250 ml)	Třecí miska s tloučkem
Laboratorní lžička	Topné hnízdo na 250ml baňku
Laboratorní spojky	Topné hnízdo na 500ml baňku
Laboratorní stojany	Trojhrdlá baňka (500 ml)
Laboratorní svorka malá	Varné baňky (100 ml, 250 ml)
Laboratorní svorka pro chladič	Vařič
Laboratorní svorky střední	Váženka
Zvedák pro topné hnízdo	Vyvíječ páry (zátky + skleněná trubice)

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Hřebíček
Hexan

POSTUP:

POZOR: Hexan je hořlavina I. třídy, nepoužívejte v blízkosti práce s ním otevřeného ohně.
Zabraňte, aby se dostala voda dovnitř topného hnízda.
Pokud se tak stane, okamžitě odpojte hnízdo z elektrické sítě.

1. Navažte 10 g hřebíčku a důkladně jej rozetřete v třecí misce za pomoci tloučku.
2. Sestavte destilační aparaturu pro destilaci s vodní parou dle **obrázku 3. Jelikož se jedná o zábrusovou aparaturu, není nutné ji utěšňovat parafilmem.** Chladič napojte dle šipek na přívod chladicí vody a odvodní hadičku z chladiče umístěte do odpadu. Obě baňky umístěte do topných hnízd. Zábrusy promažte jemnou vrstvou silikonu. Aparaturu sestavujte souběžně s umístěním

chemikálií do příslušných baněk (popsáno v bodě 3 a 4). Po sestavení nechte aparaturu zkontrolovat vedoucím cvičení.

3. Vyděrač vodní páry naplňte do $\frac{2}{3}$ destilovanou vodou a na jeho dno umístěte skleněné kuličky (varné kamínky).
4. Do trojhrdlé baňky nasypete rozetřený hřebíček a přilijte 100 ml destilované vody.
5. Mírným proudem pusťte do chladiče vodu a zapněte vyhřívání vyděrače vodních par na plný výkon. Zároveň zapněte vyhřívání trojhrdlé baňky na $\frac{1}{2}$ výkon. V průběhu destilace neustále kontrolujte aparaturu, případně regulujte teplotu vyhřívání dle pokynů vedoucího cvičení.
6. Po přibližně 30 minutách na základě pokynů vedoucího cvičení ukončete destilaci a nechte destilační aparaturu ochladit.
7. Ze získané směsi vody a silice vyextrahujte silici hexanem dle následujícího postupu. Předdestilovanou směs nalijte do uzavřené dělicí nálevky, přidejte k ní 15 ml hexanu a po uzavření nálevky zátkou obsah důkladně protřepete (**viz úloha č. 5 – Extrakce**).

Pozor na vnitřní přetlak, který je nutné průběžně uvolňovat otočením nálevky dnem vzhůru a otevřením ventilu. Před započatím extrakce upozorněte vyučujícího a zajistěte dostatečný přísun čerstvého vzduchu otevřením okna.

Po důkladném protřepání vyčkejte, až se v nálevce vytvoří rozhraní dvou vrstev. **Spodní vrstvu**, tj. vodu se zbytkem silice odlijte do kádinky. Spolu se spodní vrstvou můžete odlít i malou část horní vrstvy pro zajištění, že v horní vrstvě nebude ani část spodní vrstvy. Roztok silice v hexanu (**horní vrstva**) pak přelijte do **suché Erlenmayerovy baňky**. I minimální množství vody způsobí zakalení silice po oddestilování hexanu. Extrakci zopakujte ještě dvakrát vždy s novým podílem hexanu, který přidáváte k vodné fázi. Jednotlivé podíly silice v hexanu spojte dohromady.

8. Sestavte aparaturu pro destilaci za normálního tlaku podle **obrázku 2. Jelikož se jedná o zábrusovou aparaturu, není nutné ji utěšňovat parafilmem**. Baňku místo do topného hnízda umístěte do vodní lázně (hrnec s vodou umístěný na vařiči). Roztok silice v hexanu přelijte do malé zábrusové baňky (100 ml), na kterou nasadíte Claisenův nástavec s vodním chladičem zakončeným alonží a baňkou na kondenzát.
9. Baňku zahřívejte opatrně na vodní lázni (vařič s hrncem). Během destilace je nutno regulovat teplotu vodní lázně. Udržujte ji mezi 80-90 °C, voda tedy nesmí vřít. Zároveň sledujte teplotu v destilační aparatuře a v průběhu destilace **odečtěte na teploměru teplotu varu hexanu**. Jakmile přestane hexan destilovat, destilaci zastavte a nechte aparaturu zchladnout.
10. Pomocí Pasteurovy pipety převedte silici do **předem zvážené mikrozkuřavky (na analytických vahách)** a určete její objem (podle stupnice na mikrozkuřavce) a hmotnost (zvážením na analytických vahách). Oddestilovaný hexan přelijte do láhve k tomu určené.

VYHODNOCENÍ:

1. Vypočítejte výtěžek hřebíčkové silice na jeden gram odváženého hřebíčku.
2. Vypočítejte hustotu hřebíčkové silice.
3. Stanovte teplotu varu hexanu a srovnajte ji s tabulkovou hodnotou.
4. Zamyslete se nad tím, proč je výhodnější destilaci s vodní parou provádět výše popsaným a provedeným způsobem než destilovat danou látku společně s vodou v jedné baňce.
5. Do protokolu se pokuste odvodit systematické názvy eugenolu a acetyleugenolu dle platného názvosloví.

V případě, že jste pracovali s alternativním výchozím materiálem, otázky ve vyhodnocení analogicky upravte.

8. Úprava biologického materiálu, precipitační techniky, dialýza, centrifugace, ultrafiltrace

Úprava biologického materiálu

viz kapitola 6. Izolace nukleových kyselin

- Mletí, homogenizace, centrifugace

Precipitační metody

V počátečních fázích izolací biopolymerů jsou většinou používány méně pracné metody fázové separace, jako jsou precipitace (frakcionace), dialýza či vsádková adsorpce. Tyto metody nemají zpravidla velké rozlišení, umožňují však snadné a rychlé zakoncentrování preparátu po základní extrakci biologického materiálu. **Srážení se provádí pomocí neutrálních solí, změnou pH, organickými rozpouštědly či teplotou.**

Rozpustnost proteinů ve vodných roztocích závisí na jejich **solvatačním obalu**, tj. vrstvě molekul vody a iontů, které obalují jejich molekuly. Příčinou solvatačních obalů jsou elektrostatické síly mezi polárními strukturami proteinů a dipóly vody. **Rozpustnost proteinů se s rostoucí koncentrací solí zpravidla nejprve zvyšuje (vsolovací efekt), prochází maximem a posléze klesá (vysolovací efekt).** Vsolování je způsobeno vytvořením iontového oblaku kolem ionizovaných skupin biopolymerů – dochází ke snížení interakce nabitých skupin biopolymerů mezi sebou a zvýšení interakcí s rozpouštědlem. Dalším přidáním neutrální soli se snižuje tloušťka solvatačního obalu a efektivní koncentrace vody, a tím se snižuje i rozpustnost proteinu. Charakter závislosti rozpustnosti na koncentraci soli je určen nejen typem biopolymeru, ale i typem soli a hodnotou pH. Nejnižší je rozpustnost v izoelektrickém bodě, tj. hodnota pH, při které má molekula biopolymeru neutrální náboj.

Při frakcionaci organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou (methanol, ethanol, aceton) se využívá rozdílná rozpustnost proteinů v těchto rozpouštědlech a ve vodě. Zvyšováním koncentrace organického rozpouštědla se zmenšuje i solvatační obal kolem molekul proteinů, což nakonec vede k jejich vysrážení. Frakcionace organickými rozpouštědly se může kombinovat se změnami koncentrace solí, pH a teploty.

Tepelná denaturace nežádoucích látek

Tato metoda se používá zejména při izolaci některých termostabilních enzymů v počátečních fázích purifikačního procesu. Často se do roztoku přidává substrát, koenzym nebo inhibitor příslušného enzymu, neboť přítomnost těchto látek vede k tvorbě komplexů enzym – ligand, které se zpravidla vyznačují zvýšenou odolností vůči denaturačním vlivům. Roztok je zahříván po jistou dobu na určitou teplotu, pak je rychle ochlazen v ledové lázni a koagulované balastní biopolymery, zejména termolabilní proteiny, se odstraní centrifugací nebo filtrací. Jako příklad můžeme uvést přípravu kvasničné alkoholdehydrogenasy, kdy se extrakt v prostředí pyrofosfátového pufru zahřeje po dobu 15 minut na teplotu 55 °C na vodní lázni, a balastní proteiny se odstraní centrifugací.

Vysolování biopolymerů neutrálními solemi

Precipitovatelnost určitého proteinu z vodného roztoku je závislá na druhu použité soli, iontové síle, hodnotě pH, teplotě a koncentraci proteinů. Při **vysolovacím efektu** se uplatňuje daleko více povaha aniontu než kationtu. Dvojmocné a vícemocné anionty precipitují proteiny většinou mnohem účinněji než anionty jednomocné. Nejčastěji používanou solí pro vysolování biopolymerů je **síran amonný**. Jeho výhodou je značná rozpustnost (např. ve srovnání s Na_2SO_4), která je jen nepatrně závislá na teplotě, a malý denaturační vliv. Doporučuje se používat dostatečně čistý síran amonný bez obsahu kovových iontů, které by mohly interagovat s proteiny a katalyzovat některé oxidační reakce. Jiné soli se používají jen ve speciálních případech, např. síran hořečnatý k izolaci γ -globulinové frakce ze séra nebo chlorid sodný k precipitaci fibrinogenu. Díky své velké kapacitě a tlumivé schopnosti by byly fosforečnany ideálními srážedly, ale pro svou špatnou rozpustnost se v praxi používají jen velmi omezeně. Často používanou solí pro precipitaci některých enzymů je i chlorid manganatý.

Vlastní precipitace se provádí tak, že se do roztoku biopolymerů sůl zpravidla přidává po malých dávkách **v pevném stavu nebo jako nasycený vodný roztok za stálého míchání**, aby nedošlo k lokálnímu přesycení. Vysolování probíhá při konstantní teplotě, chlazení není vždy nezbytné. Optimální koncentrační rozsah pro frakcionaci daného proteinu je nutno najít empiricky. Množství síranu amonného, potřebného k dosažení určitého stupně nasycení, lze snadno zjistit z tabulky 3. Po přidání takového množství síranu amonného, které odpovídá 30% množství potřebného ke vzniku nasyceného roztoku této soli (v praxi označováno jako 30% nasycení), se srážejí nukleové kyseliny a poměrně málo proteinů. Mezi 30–75% nasycení pak precipituje většina proteinů. V tomto rozmezí je třeba nasycení zvyšovat po poměrně malých dávkách. Po přidání příslušného množství soli se roztok biopolymeru míchá ještě asi 20 minut a precipitát se oddělí centrifugací. Pokud je daný biopolymer obsažen v precipitátu, lze po rozpuštění sraženiny získat jeho koncentrovaný roztok. Síran amonný se z roztoku oddělí většinou dialýzou, gelovou chromatografií nebo ultrafiltrací.

Tab. 3: Množství pevného síranu amonného, které je třeba přidat k jednomu litru roztoku, aby se dosáhlo žádané změny v procentech saturace roztoku síranem amonným.

		Výsledná koncentrace síranu amonného (% saturace)																			
		10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Výchozí koncentrace síranu amonného (% saturace)	0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
	10		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
	15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
	20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
	25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
	30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546
	33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
	35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
	40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
	45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
	50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
	55												33	67	103	141	179	220	264	307	353
	60													34	69	105	143	183	227	269	314
	65														34	70	107	147	190	232	275
	70															35	72	111	153	194	237
	75																36	74	115	155	198
80																	38	77	117	157	
85																		39	77	118	
90																			38	77	
95																				39	

Srážení biopolymerů ostatními látkami

Poměrně starou metodou je precipitace biopolymerů organickými rozpouštědly. Tyto látky snižují dielektrickou konstantu prostředí, tím přispívají ke snížení rozpustnosti a k vysrážení biopolymeru (zvyšují se elektrostatické interakce mezi nabitými skupinami biopolymeru a molekuly se pak snáze shlukují do precipitujících agregátů).

Při izolaci nukleových kyselin se používá srážení koncentrovaným ethanolem (pro kvantitativní odstranění nukleových kyselin z roztoku se často používají ribonukleasy a deoxyribonukleasy). Při separaci proteinů se organická rozpouštědla využívají málo, je zde nebezpečí denaturace, které se snižuje udržováním roztoku při teplotě 0°C. Ethanolová precipitace má výhodu v tom, že odpadá potřeba dialýzy. Kromě ethanolu se především pro frakcionaci plasmových (sérových) proteinů používá methanol, aceton a ether. Při separaci citlivějších proteinů jsou organická rozpouštědla nahrazována některými kyselinami, jako je kyselina kaprylová, rivanol (2-ethoxy-6,9-diaminoakridinlaktát), nebo organickými polymery, např. polyethylenglykolem.

Ke zvýšení specifčnosti srážení je možné do roztoku přidat specifické ligandy bílkovin, např. kofaktory nebo zinečnaté ionty. V poslední době se také začal pro některé kyselé proteiny používat bazický protamin sulfát, nízkomolekulární protein izolovaný z rybího spermatu. Princip kyselý či bazický frakcionace spočívá v pomalém okyselení či zalkalizování roztoku biopolymerů na určitou hodnotu pH pomocí silné kyseliny či zásady, na které se ponechá po určitou dobu (1 hod) a po odstranění vysrážených balastů se vrátí na původní hodnotu.

Pokud je cílem kvantitativní oddělení biopolymerů z roztoku, tzn. deproteinaci, je třeba použít drastičtějších metod srážení. Lze využít např. srážecí schopnost iontů těžkých kovů (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) nebo složitějších aniontů, které tvoří s proteiny těžko rozpustné komplexy (kyseliny trichloroctová, pikrová, chloristá, fosfowolframová atd.). Tyto metody jsou použitelné tehdy, když není zájem o biopolymery, ale naopak o nízkomolekulární složky biologického materiálu.

Dialýza

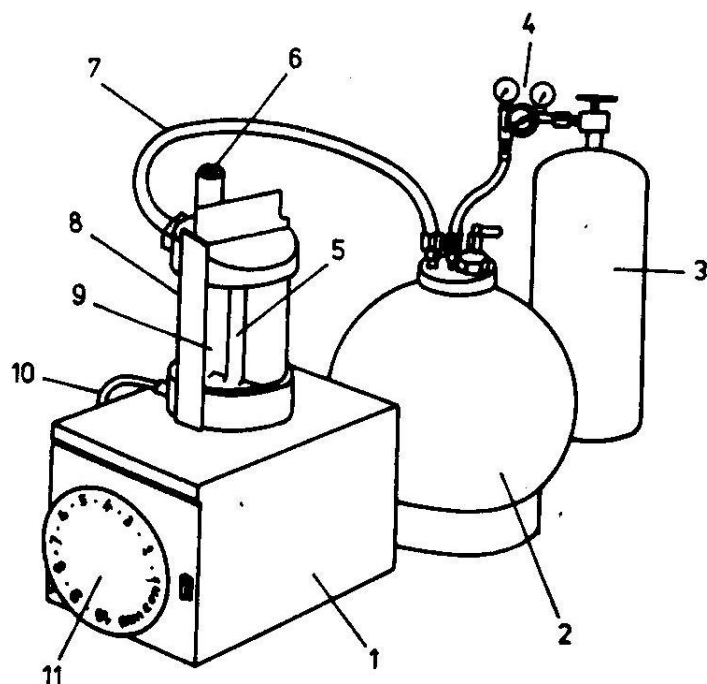
Tato separační technika využívá **difúze nízkomolekulárních látek membránou nepropustnou pro velké molekuly a částice z roztoku o vyšší koncentraci do roztoku o koncentraci nižší**. V okamžiku, kdy se koncentrace látek procházejících membránou na obou stranách membrány vyrovnají, proces se zastaví. Molekuly proteinů neprocházejí pro svou velikost otvory dialyzačních membrán. Dialýza umožňuje v biochemii např. snadné oddělení solí od roztoků proteinů (při vysolování proteinů síranem amonným), uplatňuje se i při krystalizaci proteinů. Nejčastěji se využívá tam, kde chceme vysokomolekulární látky zbavit nízkomolekulárních nečistot.

Dříve se používaly pro dialýzu membrány typu kolodium, celofán, pergamen anebo i membrány zvířecího původu (střeva, vaječná blanka, různé měchýře). Nyní jsou komerčně dostupné umělé membrány s vhodnou velikostí pórů ve tvaru dlouhé trubice různého průměru, běžným laboratorním slangem jsou tyto membrány nazývané **dialyzační střeva**. Potřebný díl dialyzační trubice se odstříhne a na jednom konci pevně zaváže nebo uzavře speciální svorkou. Před naplněním je třeba novou trubici vždy pořádně propláchnout a nechat chvíli namočenou v destilované vodě – je třeba vymýt glycerol, kterým jsou trubice impregnovány. Po naplnění preparátem určeným k dialýze se uzavře i druhý konec trubice a vloží se do nádoby s vodou nebo pufrům o nízké iontové síle. Během dialýzy je třeba myslet na to, že ve směru osmotického tlaku procházejí molekuly vody, což má za následek **naředění vzorku a zvětšení jeho objemu**, je třeba s tím během plnění dialyzačního střeva počítat, aby nedošlo k jeho poškození a ztrátě vzorku. Je snaha o to, aby dialýza byla co nejrychlejší. Rychlost dialýzy závisí na **koncentračním spádu** (zpočátku je rychlejší, postupně se zpomaluje), který je ovlivněn především poměrem objemů vně a uvnitř membrány. Rychlost tohoto procesu dále závisí na teplotě, na počtu a velikosti pórů v membráně, na síle membrány, na elektrických interakcích mezi membránou a difundujícími částicemi a na velikosti plochy membrány. Míchání a obvykle i výměna kapaliny velmi zrychlují postup dialýzy. Protože dialýza trvá zpravidla desítky hodin, provádí se obvykle přes noc při teplotě 0-4 °C, aby se zabránilo denaturaci proteinů a množení mikroorganismů.

Ultrafiltrace

Podobně jako dialýza, používá se ultrafiltrace pro separaci či zakoncentrování rozpuštěných látek s molekulovou hmotností vyšší než 10^4 . Ultrafiltrace je proces, při kterém rozpouštědlo a rozpuštěné látky až do určité kritické velikosti procházejí membránou na základě tlakového gradientu, určujícím faktorem je pórovitost membrány. Při ultrafiltraci se může využívat pozitivní nebo negativní tlak. **Pozitivního tlaku** se dosahuje inertním plynem, převážně dusíkem, který se udržuje nad filtrovaným roztokem (**retentát**). Roztoky se filtrují pod tlakem 0,05 až 0,5 MPa nebo působením odstředivé síly v centrifuze. Naopak **negativní tlak** se udržuje pomocí vakua, které působí v prostoru již přefiltrovaného roztoku (**difuzát**). Rozpouštědlo a rozpuštěné látky s menšími relativními molekulovými hmotnostmi, než jsou póry v membráně, procházejí do **ultrafiltrátu**. Látky s vyššími molekulovými hmotnostmi se pak nad membránou postupně zahušťují. Zakoncentrovaný retentát lze zředit čistým rozpouštědlem a

pokračovat v ultrafiltraci. Tím se postupně snižuje podíl nízkomolekulárních látek v retentátu. Při tomto způsobu dialýzy, nazývaném **diafiltrace**, se požadovaného výsledku dosáhne za 1/10 až 1/100 času potřebného pro konvenční dialýzu.

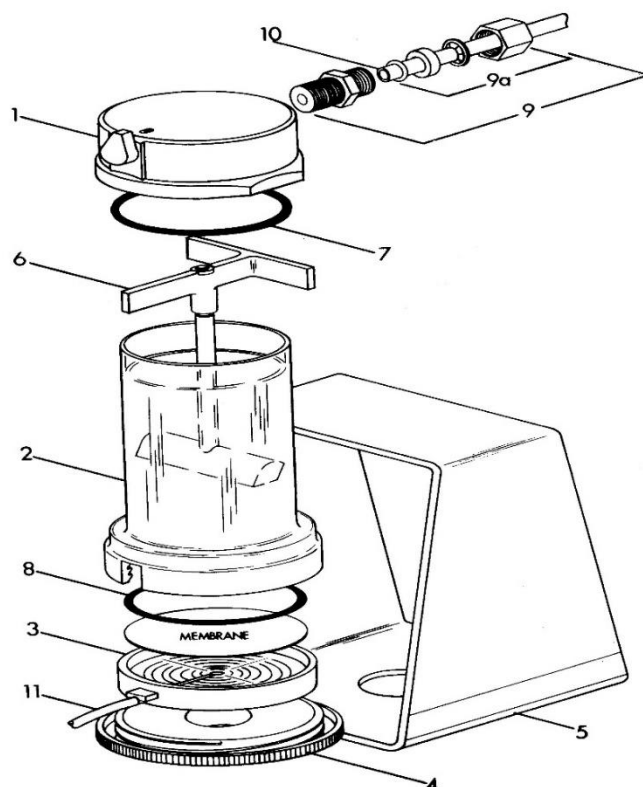


Obr. 8: Zařízení pro ultrafiltraci.

1 – elektromagnetická míchačka; 2 – zásobník na dusík; 3 – ocelová láhev s dusíkem; 4 – regulátor tlaku; 5 – elektromagnetické míchadlo; 6 – tlakový zabezpečovací ventil; 7 – přívodní hadice dusíku; 8 – ultrafiltrační cela; 9 – svírací stojan; 10 – hadička pro odtok difuzátu; 11 – ovládání rychlosti míchání.

Hlavním požadavkem na membránový filtr je, aby s dostatečnou rychlostí propouštěl rozpouštědlo (vodu) a nízkomolekulární látky a aby jeho póry měly standardní rozměr. Tyto vlastnosti nemají klasické celofánové či celulosové membrány používané pro klasickou filtraci či dialýzu, jejichž stěna má šířku 0,1 – 1,0 mm. Proto se membránové filtry zhotovují z **anizotropních polymerů se šířkou stěny 0,1 – 1,5 μm**. S takovými filtry by se však těžko manipulovalo, a proto se připevňují na **podpurný materiál**, který má obvykle podobné chemické složení a jeho póry jsou podstatně větší než póry ultrafiltru. Průměr pórů membránových filtrů se pohybuje v rozmezí **od 0,1 do 50 nm**.

V biochemických laboratořích se nejčastěji setkáte s ultrafiltračními celami a filtry firmy **Amicon** (Obr. 9). Tato firma dodává filtry s póry o průměru 0,2 - 20 nm, které umožňují dělit látky s relativními molekulovými hmotnostmi **od 500 do 300 000 Da**. Podle typů jsou odolné vůči vodě a různým organickým rozpouštědlům, dá se s nimi pracovat až do teploty 200 °C a lze je vystavit působení zředěných kyselin, hydroxidů a oxidačních látek. Při správném zacházení se mohou ultrafiltry používat opakovaně mnohokrát za sebou. Pro účinnou ultrafiltraci je třeba zajistit, aby se zadržované molekuly nehromadily na povrchu filtru a nezacpávaly jeho póry, toho se dosáhne kontinuálním mícháním nebo probubláváním.



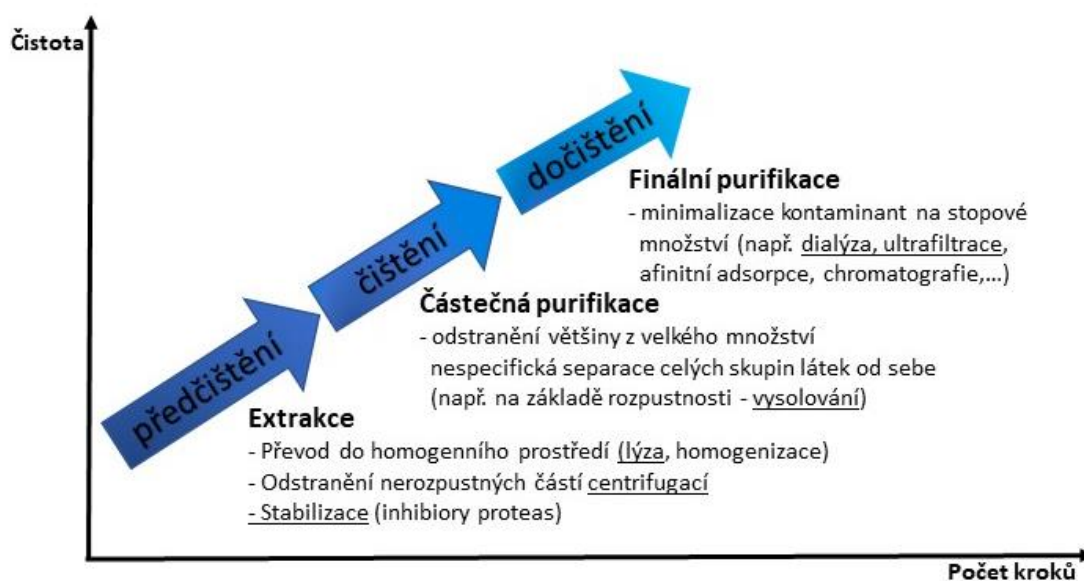
Obr. 9: Ultrafiltrační cela Amicon 8200.

1 – víko; 2 – nádoba na retentát; 3 – nosič membrány s odvodnými kanálky; 4 – spodní šroub; 5 – stojan na celu; 6 – magnetické míchadlo; 7-8 – těsnění; 9-10 – přívod dusíku; 11 – odvod difuzátu.

ÚKOL č. 1: Homogenizace semen ječmene, precipitace jejich proteinů síranem amonným s následnou dialýzou (a teoretickou ultrafiltrací na zařízení Amicon)

Nabobtnalá semena obilnin jsou vhodným zdrojem pro studium enzymů aktivních v raných fázích vývoje rostlin, zejména pro vysoké aktivity a snadnou finanční dostupnost. Naklíčený ječmen (slad) je také výborným zdrojem amylas, enzymů významných v technologické praxi, především v lihovarnictví a pivovarnictví. Ve sladu jsou zastoupeny dva enzymy, které štěpí $\alpha(1-4)$ glykosidovou vazbu polysacharidů: α -amylasa (1,4- α -D-glukan-glukanonhydrolasa; EC 3.2.1.1) a β -amylasa (1,4- α -D-glukan-maltohydrolasa; EC 3.2.1.2). Jak napovídají systematické názvy, první enzym štěpí molekulu škrobu ve vnitřní části řetězce za vzniku dextrinu (glukanů), kdežto druhý odštěpuje disacharid maltosu z neredukujícího konce řetězce.

V tomto úkolu budete homogenizovat semena ječmene v prostředí Tris/acetátového pufru, následně budete z homogenátu vysolovat proteiny síranem amonným, čímž získáte částečně purifikovanou frakci proteinů. Finální purifikaci (odstranění amonných iontů z vysolování síranem amonným) provedete dialýzou v Tris/acetátovém pufru. Jiným způsobem finální purifikace je ultrafiltrace za použití ultrafiltrační cely Amicon. Jelikož je ultrafiltrace pro toto cvičení časově náročná, vedoucí cvičení vám názorně ukáže a teoreticky vysvětlí použití ultrafiltrační cely.



Obr. 10: Obecná strategie purifikace ve třech krocích.

POJMY:

- **Precipitát, pelet** – pevná, usazená část po centrifugaci
- **Supernatant** – čirá kapalina nad precipitátem
- **Difuzát** – kapalina procházející membránou při ultrafiltraci
- **Retentát** – roztok vysokomolekulárních látek neprocházející ultrafiltrační membránou a zůstávající v ultrafiltrační cele.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Kuchyňský mixér

Centrifuga

Třecí miska s tloučkem

Elektromagnetická míchačka

Elektromagnetické míchadlo

Mikrozkumavky

Miska s ledem

Dialyzační střevo

Spony na dialyzační střevo

Odměrné válce

Ultrafiltrační cela Amicon

Ocelová láhev s dusíkem

Předvážky

Zkumavky

Pipety

Kádinky

Lžička

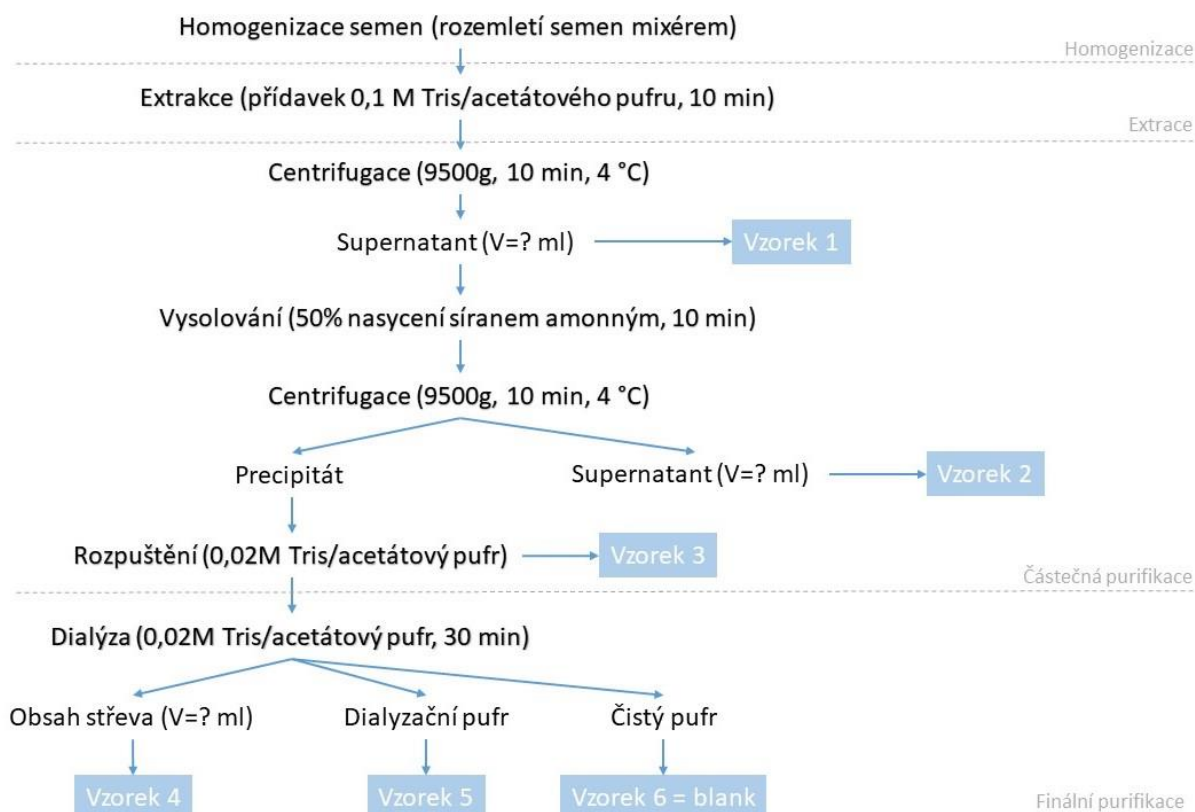
CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

50 g nabobtnalých ječmenných obilí

0,1 mol·l⁻¹ Tris/acetátový pufr, pH 7,6 (pro homogenizaci)

Pevný síran amonný

SCHÉMA EXPERIMENTU:



POSTUP:

1. Vodu z kádinky s nabobtnalými semeny slijte, nabobtnalá semena rozemelte pomocí kuchyňského mixéru a na předvážkách navažte přesně 50 g této rozemleté kaše.
2. K rozemleté kaši přidejte dvojnásobný objem (100 ml) 0,1 mol·l⁻¹ Tris/acetátového pufru, pH 7,6.

3. Kádinku s extraktem přeneste do nádoby s ledem, extrakt zde ponechejte za občasného míchání stát 10 minut.
4. Po deseti minutách extrakt (bez rozemletých semen) rozdělte do dvou (příp. čtyř) kyvet, které je třeba pečlivě vyvážit na předvážkách. Plastovou kádinku s nápisem „Vyvážení“ umístěte na předvážky, váhy vynulujte. Kyvetu s extraktem umístěte do kádinky a společně s víčkem ji zvažte. **Hodnotu si запиšte, tato hodnota musí být stejná pro obě (příp. všechny čtyři) kyvety!!!**
5. Extrakt centrifugujte 10 minut při 9500g a 4°C. Centrifugu vám dopředu vychladí (4 °C) vedoucí cvičení.

Vy si pouze zkontrolujte, zda všechny nastavené parametry souhlasí (teplota, čas, otáčky), na panel centrifugy nesahejte ani nemanipulujte s nastavením!!!

6. Po 10 minutách centrifugu otevřete, odšroubujte víko (to bezpečně položte na pevný a rovný povrch stolu). Supernatant ze všech kyvet opatrně přelijte do čisté kádinky. V odměrném válci změřte jeho objem. **0,6 ml supernatantu (extraktu) odeberte do mikrozkušavky (VZOREK Č. 1).**
7. Podle tabulky 3 zjistěte potřebné množství síranu amonného pro 50% nasycení, toto množství síranu amonného odvažte a důkladně rozetřete ve třecí misce.
8. Extrakt přelijte do kádinky s elektromagnetickým míchadlem a kádinku umístěte do misky s ledem na elektromagnetickou míchačku. Po dobu 10 minut postupně k extraktu přidávejte odvážené množství síranu amonného, další přírůstek vždy až po rozpuštění předešlého. Během těchto 10 minut umyjte všechny kyvety, které jste použili.
9. Extrakt s dokonale rozpuštěným síranem amonným rozdělte do dvou kyvet a centrifugujte (9500g, 10 min, 4°C). Během těchto 10 minut si připravte 1 litr 0,02 mol·l⁻¹ Tris/acetátového pufru, pH 7,6, který získáte ředěním 0,1 mol·l⁻¹ Tris/acetátového pufru, pH 7,6 (výpočet vám zkontroluje vedoucí cvičení).
10. Ze supernatantu odpipetujte 0,6 ml do mikrozkušavky (**VZOREK Č. 2**), zbytek odstraňte a precipitát rozpustíte v 10 ml 0,02 mol·l⁻¹ Tris/acetátového pufru, pH 7,6.
11. **Z rozpuštěného precipitátu odeberte 0,6 ml do mikrozkušavky (VZOREK Č. 3). Zbytek rozpuštěného precipitátu použijte na dialýzu.**
12. Opatrně rukou vytáhněte dialyzační střevo z roztoku 20% (50%) ethanolu.

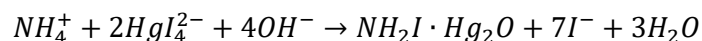
Se střevem pracujte velmi opatrně, aby nedošlo k jeho poškození!!!

13. Pomocí stříčky s destilovanou vodou střevo opláchněte zevnitř i zvenčí – oplach provedte 3x. Na jeden konec střeva poté upevněte sponu a do střeva nalijte destilovanou vodu, uzavřete střevo sponou i z druhé strany. Zkuste, zda střevo neprotéká.
14. Místo vody do střeva přes malou nálevku nalejte 10 ml rozpuštěného precipitátu.
15. Střevo umístěte do 1 l kádinky. Do kádinky nalijte 900 ml 0,02 mol·l⁻¹ Tris/acetátového pufru pH 7,6. Nechejte dialyzovat v lednici (cca 30 min) a během této doby provedte odběr čistého dialyzačního pufru (**VZOREK Č. 6**), který použijete jako slepý vzorek (**BLANK**). **Dále dle pokynů vedoucího cvičení provedte sestavení ultrafiltrační cely Amicon a seznamte se s dalšími možnostmi používanými pro zahušťování proteinů a ultrafiltraci.**
16. **Ukončete dialýzu.** Ze střeva odeberte veškerý vzorek a změřte jeho objem. Odeberte 0,6 ml vzorku (**VZOREK Č. 4**), dále odeberte 0,6 ml dialyzačního pufru, ve kterém dialýza probíhala (**VZOREK Č. 5**).
17. Střevo důkladně opláchněte destilovanou vodou a vraťte vedoucímu cvičení.

ÚKOL č. 2: Stanovení amonných iontů reakcí s Nesslerovým činidlem

PRINCIP:

Amonné ionty reagují s Nesslerovým činidlem (tetrajodortužnatan draselný) za vzniku červenohnědého produktu, který lze stanovit spektrofotometricky s absorpčním maximem při 436 nm.



LABORATORNÍ POMŮCKY:

Zkumavky

Pipety

Špičky

Vortex

CHEMIKÁLIE:

Nesslerovo činidlo pro detekci amonných iontů

POSTUP:

POZOR: Při práci s Nesslerovým činidlem použijte rukavice!!!

1. Do 6 zkumavek označených 1-6 pipetujte 1,5 ml destilované vody.
2. Přidejte 0,5 ml odebraných vzorků.
3. Do každé zkumavky přidejte 0,1 ml Nesslerova činidla
4. Po 5 minutách obsah zkumavek promíchejte na vortexu.
5. Porovnejte kolorimetricky zbarvení v jednotlivých zkumavkách. Zbarvení zkumavek vyfoťte.

VYHODNOCENÍ:

1. Do protokolu vložte foto zbarvení jednotlivých vzorků po přidání Nesslerova činidla. Okomentujte jednotlivá zbarvení.
2. Srovnajte proměřené vzorky – který vzorek by měl být nejvíce zbarvený a proč? Odpovídá předpoklad Vašim výsledkům? Pokud ne, zdůvodněte.

ÚKOL Č. 3: Stanovení obsahu proteinů Bradfordovou metodou

(teorie viz Úloha č. 2 Spektrofotometrická měření)

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Zkumavky

Vortex

Pipety

Kyvety

Špičky

Spektrofotometr Lightwave II

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Bradfordovo činidlo pro měření koncentrace proteinů

POSTUP:

1. Sedm skleněných zkumavek popište čísly 1-7.
2. Do zkumavky č. 1 pipetujte 20 µl extrakčního pufru. Tato zkumavka bude sloužit jako **BLANK**.
3. Do zkumavek č. 2-3 přidejte 20 µl extraktu z ječmenných obilek (**VZOREK Č. 1**).
4. Do zkumavek č. 4-5 přidejte 20 µl supernatantu po vysolení (**VZOREK Č. 2**).
5. Do zkumavek č. 6-7 přidejte 20 µl odsoleného vzorku z dialýzy (**VZOREK Č. 4**).
6. Do všech zkumavek pipetujte 2 ml Bradfordova činidla.
7. Obsah zkumavek promíchejte na vortexu a nechejte stát 5 min při laboratorní teplotě.
8. Zapněte spektrofotometr. Vyberte možnost Applications (1), dále zvolte Single wavelength (1), nastavte vlnovou délku 595 nm, potvrďte zeleným tlačítkem OK.
9. Do kyvetového prostoru umístěte kyvetu se slepým vzorkem (**BLANK**). Před tím, než kyvetu vložíte do spektrofotometru, je nutné se ujistit, že kyveta je zvenku suchá, případně ji osušit papírovým ubrouskem.
10. Zmáčkněte modré tlačítko pro blank.
11. Vzorek z kyvety vylijte a nahradte postupně vzorky ze zkumavek 1-6. Pro měření stiskněte zelené tlačítko. Naměřené hodnoty absorbancí si zapište.

VYHODNOCENÍ

1. Určete obsah proteinů v 1 ml extraktu, v 1 ml supernatantu po vysolení a v 1 ml vzorku po dialýze.
2. Pro výpočet využijte kalibrační křivku na BSA, kterou jste získali v úloze 2. Spektrofotometrická měření. Pokud byla vaše kalibrační křivka nepřesná (konzultujte s vedoucím cvičení), použijte rovnici pro stanovení $y = 0,0029x + 0,0125$. Nezapomeňte, jaká množství vzorků z celkového objemu jste ke stanovení použili.
3. Vypočítejte celkové množství extrahovatelných proteinů v jednom gramu obilek.
4. Vypočítejte procentuální množství proteinů, které izolujete z extraktu po 50% vysolení síranem amonným a kolik proteinů zůstane v supernatantu po vysolení. Nezapomeňte, že jste precipitát rozpouštěli v 10 ml pufru.
5. Popište a zhodnoťte purifikační proces (využijte výsledků reakce s Nesslerovým činidlem).
6. Navrhněte alternativní kroky, které byste mohli použít pro homogenizaci, precipitaci a odsolení izolovaných proteinů.
7. Zamyslete se a s pomocí literatury vypište biologicky aktivní látky, které jsou přítomné v obilkách. Zkuste se zamyslet nad jejím kvantitativním obsahem.

9. Titrace

Titrace (titrační stanovení, odměrná analýza, volumetrie) je obecně **přímou kvantitativní metodou**, pomocí níž se stanovuje množství jednotlivých složek v analyzovaném vzorku. Tyto složky bývají předem určeny kvalitativně – tedy je stanovena pouze jejich přítomnost ve vzorku. Titrace se provádí v kapalném prostředí.

Titrační stanovení využívá stechiometricky probíhajících analytických reakcí. Jsou zde dané podmínky pro tyto reakce:

- musí probíhat jednoznačně (titrační činidlo nesmí reagovat s více složkami ve vzorku),
- musí probíhat dostatečně rychle (dosažení rovnováhy by mělo být limitováno jen mícháním),
- nesmí být rušeny vedlejšími reakcemi
- musí probíhat kvantitativně (rovnováha reakce musí být posunuta jednoznačně směrem k tvorbě produktů) s možností snadno identifikovat konec reakce.

Principem titrace je přesné měření objemu roztoku titračního činidla, které je postupně přidáváno např. z byrety, k přesně známému objemu roztoku analyzovaného vzorku až do okamžiku, kdy mezi nimi proběhne kvantitativně chemická reakce (tzv. bod ekvivalence). Díky znalosti objemu titračního činidla, jeho koncentrace a objemu roztoku analyzovaného vzorku, lze pomocí stechiometrických poměrů dané chemické reakce stanovit ekvivalent množství analyzované látky či přímo jeho koncentraci.

Dle provedení titračního stanovení rozlišujeme titrace:

- A. Přímé** – titrační činidlo se přidává přímo k roztoku analyzovaného vzorku až do okamžiku, kdy jsou látková množství obou roztoků ekvivalentní
- B. Nepřímé** – k roztoku analyzovaného vzorku se přidává nadbytek titračního činidla, čímž se vytvoří produkt, který se teprve pak titruje
- C. Zpětné** – k roztoku analyzovaného vzorku se přidá přesný objem titračního činidla v nadbytku, proběhne kvantitativní reakce, poté se nadbytek titračního činidla titruje jiným titračním činidlem.

Určení bodu ekvivalence

Vizuální indikace

Během vizuální indikace konce titrace se využívá výrazné změny ve vzhledu titrovaného roztoku. Tato změna je způsobena buď přeměnou samotných reagujících látek, nebo přeměnou pomocných látek přidávaných do roztoků (chemické indikátory).

Bezindikátorové způsoby určení bodu ekvivalence

Nejznámější z těchto využívá při titracích odměrný roztok manganistanu, který při malých koncentracích intenzivně fialově zbarvuje roztok. Při titracích v kyselém prostředí se činidlo redukuje na bezbarvé ionty manganaté, dokud je v roztoku stanovované redukovalo. Ukončení reakce je indikováno prvním přebytkem činidla, které zbarví titrovaný roztok růžovo-fialově.

Bez použití indikátorů lze zjistit konec titrace také u srážecích titrací halogenidů, kdy vzniká zakalený koloidní roztok. Postupuje-li se po dostatečně malých přídavcích, dojde po mírném překročení bodu

ekvivalence ke zřetelnému vyčření roztoku, sraženina ztratí koloidní charakter a koaguluje do větších částic usazující se suspenze.

Indikátorové způsoby určení bodu ekvivalence

Jako indikátory se používají látky stejného typu. Rozlišují se tedy následující indikátory:

- **indikátory acidobazické** – slabé organické kyseliny nebo zásady, charakterizované protolytickou rovnováhou, během titrace mění bravu v závislosti na pH;
- **indikátory metalochromní** – komplex se stanovovaným iontem kovu je odlišně zbarvený od iontu volného indikátoru (xylenolová oranž – z červené či fialové přechází na žlutou, murexid – ze žluté či červené přechází na fialovou);
- **indikátory srážecích titrací** – tvoří s titračním činidlem barevné sraženiny, popř. rozpustné barevné komplexy, nebo mohou způsobit změnu zbarvení sraženiny nebo roztoku v bodě ekvivalence kvůli adsorpci nebo naopak desorpci z částic sraženiny;
- **indikátory redoxní** – redukováná forma je barevně odlišná od oxidované formy (benzidin, difenylamin, methylenová modř – všechny přechází z bezbarvé na modrou); indikátory, které mohou přecházet plynule z oxidované formy na redukovanou a naopak, se nazývají vratné indikátory, existují i indikátory nevratné.

Instrumentální indikace

Při instrumentálních metodách indikace se sleduje průběh titračních křivek měřením změn vhodných veličin, které se podle potřeby převádějí na změny elektrického signálu.

Potenciometrické titrace

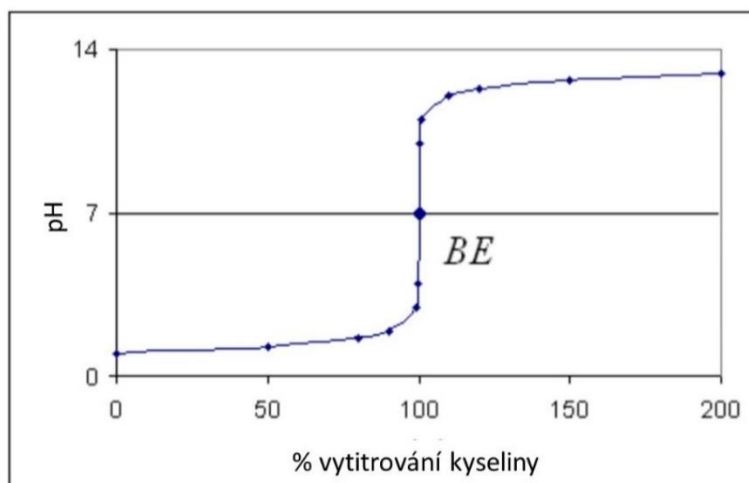
Protože podle Nernstovy rovnice potenciál obecně závisí na koncentracích iontů v roztoku, lze měřením potenciálu pomocí vhodné indikační elektrody sledovat i další veličiny odvozené od koncentrací, např. pH, a indikovat tak průběh všech typů titrací.

Pro rovnovážný potenciál elektrody pak platí, že:

$$E = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{prod}}}{a_{\text{reak}}},$$

- kde: E^0 ... standardní elektromotorické napětí článku
R ... molární plynová konstanta
F ... Faradayova konstanta
a ... aktivita

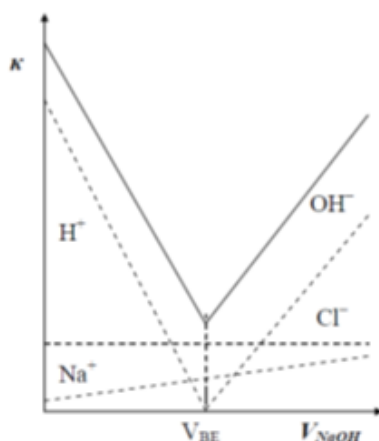
Při potenciometrické indikaci se do titrovaného roztoku ponoří referenční elektroda a vhodná indikační elektroda a pomocí potenciometru se měří elektromotorické napětí článku v závislosti na přidávaném množství titračního činidla. Potenciometrickou titrační křivku ukazuje Obr. 1.



Obr. 1: Znárodnění potenciometrické titrační křivky. Titrace roztoku HCl roztokem NaOH.

Konduktometrické titrace

Konduktometrická (vodivostní) indikace konce titrace se s výhodou využívá při titracích, kdy vznikají málo disociované nebo málo rozpustné produkty, což je převážně při acidobazických titracích, kdy vzniká málo disociovaná voda, příp. při chelatometrických a srážecích titracích. Vodivost roztoků je přímo úměrná koncentraci iontů, které jsou v roztoku přítomny. K titraci se používají co nejkonzentrovější roztoky titračních činidel, aby se zabránilo deformaci lineární závislosti zředováním titrovaného roztoku. Konec titrace se určuje podle zlomu na titrační křivce.



Obr. 2: Konduktometrická titrační křivka. Titrace roztoku HCl roztokem NaOH.

Metody titračního stanovení a používané indikátory

Metody titračního stanovení se podle principu chemické reakce, která během nich probíhá, dělí na acidobazické, komplexotvorné, srážecí a oxidačně-redukční.

Acidobazické titrace

Principem acidobazické titrace je neutralizační reakce, kdy je kyselina (resp. zásada) titrována zásadou (resp. kyselinou).



Jako acidobazické indikátory se využívají slabé organické kyseliny nebo zásady. Odevzdáním, resp. přijmutím protonu přecházejí na svou konjugovanou formu, přičemž tento přechod je doprovázen změnou zbarvení. Toto zbarvení závisí na poměru koncentrací ionizované a neionizované formy indikátoru. Oblast pH, ve které nastává pozorovatelná změna zbarvení indikátoru, se nazývá oblast barevného přechodu indikátoru neboli funkční oblast indikátoru. Indikátor pro danou titraci se volí tak, aby oblast barevného přechodu odpovídala pH v okolí bodu ekvivalence na titrační křivce. V tabulce 2 je shrnut přehled nejpoužívanějších acidobazických indikátorů.

Tab. 1: Přehled acidobazických indikátorů

Indikátor	Funkční oblast	Zbarvení	
		kyselé formy	zásadité formy
Thymolová modř	1,2 – 2,8	červené	žluté
Methyloranž	3,1 – 4,5	červené	žluté
Methylčervěň	4,4 – 6,3	červené	žluté
Bromthymolová modř	6,0 – 7,6	žluté	modré
Fenolftalein	8,2 – 10,0	bezbarvé	červenofialové
Thymolftalein	9,3 – 10,5	bezbarvé	modré

Komplexotvorné titrace

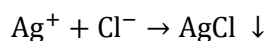
Komplexotvorné titrace, jinak chelatometrie, je metoda založená na tvorbě rozpustného komplexního iontu, kdy volný kationt stanovovaného kovu vymizí z roztoku.

Bod ekvivalence lze indikovat pomocí kovových iontů, přičemž rozlišujeme kovové indikátory jednobarevné (thiokyanatan, kyselina sulfosalicylová) a metalochromní (obvykle slabé organické vícesytné kyseliny, jejichž anionty jsou dle pH různě zbarvené – murexid, xylenová oranž).

Srážecí titrace

Srážecí titrace jsou titrace založené na vzniku málo rozpustných sloučenin, kdy titrovaná látka vymizí z roztoku, protože je z něj vysrážena.

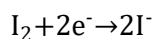
Příkladem je argentometrie, která využívá tvorby nerozpustných solí s kationtem Ag^+ . Titračním činidlem je zde roztok AgNO_3 . Argentometrie je vhodná pro stanovení iontů Cl^- , Br^- , I^- , CN^- , SCN^- , aj.



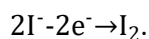
Oxidačně-redukční titrace

Během oxidačně-redukční titrace je titrovaná látka zoxidována (resp. zredukována) oxidujícím (resp. redukujícím) titračním činidlem.

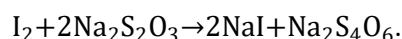
Příkladem oxidačně-redukční titrace je jodometrie, což je souhrn odměrných stanovení založených jednak na redukci jodu na jodid v neutrálním prostředí podle rovnice:



a také na oxidaci jodidu v kyselém prostředí na jod podle rovnice:



Vyloučený jod je dále titrován odměrným roztokem thiosíranu sodného za vzniku tetrathionanu sodného:



Indikátor používaný během jodometrie je škrobový maz, který se barví roztokem jodu modře, titrovat je třeba za studena. Škrob se skládá z amylosy a amylopektinu. Amylosa poskytuje s jodem intenzivně modré zbarvení. Podstata reakce spočívá v tom, že molekuly jodu se dostávají do vnitřní dutiny šroubovice amylosy a vzniklý tvar absorbuje světelné záření. Stanovení přesné koncentrace jodu se provádí odměrným roztokem thiosíranu sodného o známé koncentraci.

Příprava titračních činidel

Volumetrická analýza začíná přípravou odměrných roztoků o přesné koncentraci. Díky znalosti přesné koncentrace a spotřeby odměrného činidla je pak možné spočítat koncentraci titrované látky. Proto je důležité věnovat tomuto kroku maximální pozornost. Odměrné roztoky se zpravidla připravují z takových látek, které mají jasně definovaný obsah a čistotu a časem nepodléhají změnám. Není-li možné takovou látku použít, je třeba po přípravě odměrného roztoku provést tzv. **standardizaci**. Jedná se o proces, kdy je připravena pouze přibližná koncentrace titračního činidla a přesná koncentrace je určena titrací standardu, tedy látky o přesné koncentraci, která splňuje podmínky o definovaném obsahu, čistotě a časové stálosti. Teprve po standardizaci a tím zjištění přesné koncentrace odměrného roztoku je možné přejít k samotnému stanovení koncentrace neznámého vzorku.

Titrační činidla pro acidimetrii

Acidimetrie je metoda stanovení zásad, jako titrační činidlo se používá tedy kyselina. Nejčastěji používanými titračními činidly jsou roztoky kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové o koncentracích 0,05 až 0,1 mol·l⁻¹. Ředěním koncentrovaných roztoků těchto kyselin se připravují titrační roztoky o přibližné koncentraci.

U alkalimetrie se používají následující standardy:

1. **hydrogenuhličitan draselný (KHCO₃)** – odvážené množství se po rozpuštění titruje podle reakce:



2. **uhličitan sodný (Na₂CO₃)** – zde probíhá titrace podle reakce:



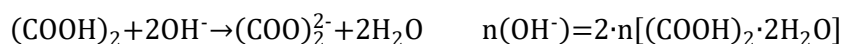
Titrační činidla pro alkalimetrii

Alkalimetrie je metoda stanovení kyselin, jako titrační činidlo se používají roztoky zásad. Nejčastěji používanými odměrnými roztoky v alkalimetrii jsou roztoky alkalických hydroxidů o koncentracích 0,05 až 0,1 mol·l⁻¹. Lze je připravit rozpuštěním pevných komerčních preparátů, které však i při nejvyšší deklarované čistotě obsahují často jen kolem 90 % čistého NaOH nebo KOH, zbytek tvoří neurčité množství vlhkosti a zejména uhličitany. Je tedy zřejmé, že koncentrace odměrných roztoků hydroxidů připravených jakýmkoliv způsobem je jen přibližná a vždy je nutné stanovit jejich přesnou koncentraci. Jako standardy se v alkalimetrii používají:

1. **hydrogenftalan draselný (KHFTal)** – odvážené množství se po rozpuštění titruje podle rovnice:

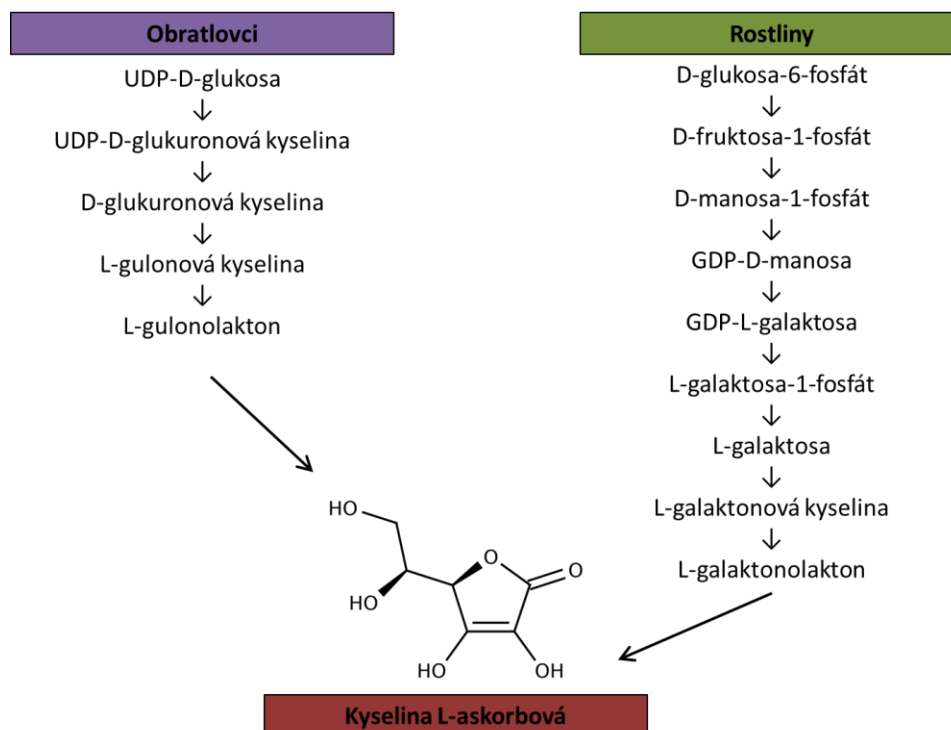


2. **dihydrát kyseliny šťavelové (H₂C₂O₄·2H₂O)** – tuto slabou dvojsytnou kyselinu můžeme titrovat do II. stupně odměrným roztokem NaOH prostým uhličitany dle rovnice:



Vitamín C

Vitamín C se řadí mezi vitamíny rozpustné ve vodě a nejčastěji je označován jako kyselina L-askorbová. Jedná se o γ-lakton kyseliny 2-oxo-L-gulonové, jehož biosyntéza probíhá u řady organismů, avšak s výjimkou člověka, morčete, primátů, indického netopýra, některých ptáků a bezobratlých (Obr. 1).



Obr. 3: Schéma biosyntézy kyseliny askorbové u obratlovců a rostlin.

Pod názvem vitamín C je nejen označována kyselina L-askorbová, ale také její celý reversibilní redoxní systém zahrnující produkty její oxidace – kyselinu L-monodehydroaskorbovou a kyselinu

L-dehydroaskorbovou. Kyselina askorbová tvoří bezbarvé krystaly dobře rozpustné ve vodě (1 g na 3 ml vody), špatně rozpustné v alkoholu (1 g na 50 ml) a ostatních organických rozpouštědlech. Ve vodném prostředí se chová jako středně silná dvojsytná kyselina s disociačními konstantami $pK_1 = 4,17$ a $pK_2 = 11,57$.

Vitamín C je nejznámější a nejrozšířenější ze všech vitamínů, jedná se o nejčastěji používaný potravinový doplněk. Průmyslově se vyrábí z D-glukosy, která je katalytickou dehydrogenací převedena na D-sorbitol. Poté následuje mikrobiální oxidace díky *Acetobacter suboxidans*, která vede k produkci L-sorbosy. L-sorbosa v reakci s acetonem v prostředí kyseliny sírové poskytuje 2,3:4,6-bis-(O-isopropyliden)- α -L-sorbofuranosu. Oxidací tohoto produktu pomocí manganistanu draselného v alkalickém prostředí se získá kyselina diaceton-2-oxo-L-gulonová. Po hydrolýze chránících skupin (ketalů) vzniká kyselina L-askorbová.

Obsah vitamínu C v potravinách je velmi proměnlivý, závisí na geografických podmínkách, skladování, tepelné úpravě a na mnoha dalších faktorech. Například vařením se ničí až 60 % vitamínu C, sušením až 50 %, šetrnější je dušení v páře. Nejšetrnější k vitamínu C je mražení. Nejvíce vitamínu C obsahují ještě nezralé zelené plody. Bohatým zdrojem vitamínu C jsou šípky (8000 mg/kg), černý rybíz (1360 mg/kg), naťová petržel (1369 mg/kg), avšak vzhledem k příležitostné konzumaci malého množství nejsou příliš významné pro pokrytí denní potřeby. Co se týče potravin živočišného původu, větší množství vitamínu C obsahují játra (hovězí 300 mg/kg).

Co se týče doporučeného denního dávkování vitamínu C, k prevenci proti kurdějím (skorbut, avitaminóza C, projevuje se krvácivostí dásní) se doporučuje přijímat 10-12 mg denně. Avšak pro správné fungování organismu je tato dávka nedostačující. Podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví České republiky je průměrná denní potřeba 60 mg. Hlavní funkcí vitamínu C v lidském organismu je účast v oxido-redukčních dějích. Kyselina askorbová i její isomery a deriváty mohou reagovat s volnými radikály, které způsobují oxidaci lipidů a dalších oxidovatelných složek potravin a působí jako antioxidanty. Kyselina askorbová se podílí rovněž na hydroxylaci prolinu, aminokyseliny, která je hlavní složkou kolagenu nezbytného pojiva v kůži, kostech, kloubech, šlachách a chrupavkách. Pokud není v těle dostatek vitamínu C, nedochází k hydroxylaci prolinu a špatně se tvoří kolagen. Je známo, že železo obsažené v ovoci, zelenině a obilninách se v těle poměrně špatně vstřebává. Vitamín C zlepšuje vstřebávání železa až o 85 %, při jeho nedostatku se doporučuje zvýšit příjem vitamínu C namísto zvýšení konzumace železa. Další funkcí vitamínu C je napomáhání syntézy karnitinu z aminokyseliny lysinu. Karnitin transportuje mastné kyseliny do mitochondrií, kde dochází k jejich degradaci.

Vitamín C je rovněž bohatě využíván v potravinářství, kde se řadí mezi tzv. přídatné látky (aditiva), konkrétně do skupiny antioxidantů. Označuje se jako E300, E301 značí askorbát sodný, E304 estery kyseliny askorbové askorbylpalmitát a askorbylsteárat. Díky svým vlastnostem – vitamín, antioxidant, chelatační činidlo, má uplatnění v konzervárenství, kvasné technologii a technologii masa, tuků a cereálií. Hydrofilní sůl askorbátu sodného a lipofilní kyselina 6-palmitoyl-L-askorbová inhibují vznik nitrosaminů v nakládaném masu a masných výrobcích. Hojně se přidává do ovocných džusů, konzervovanému či mraženému ovoci, aby nedošlo během skladování a zpracování ke změnám kvality. V množství 20-30 mg/kg se přidává do piva pro zabránění tvorby chladových a oxidačních zákalů, také nežádoucích změn sensorických vlastností. Kyselina askorbová je využívána rovněž i při výrobě vína, kdy umožňuje snížení použití oxidu siřičitého k síření. V množství 10 – 100 mg/kg se používá v pekařství jako prostředek zlepšující pekařské vlastnosti mouky. Askorbylpalmitát se používá v množství 0,006 – 0,04 % jako antioxidant tuků.

ÚKOL Č. 1: Jodometrické stanovení kyseliny askorbové

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Erlenmayerova baňka	Gumový nástavec na skleněnou pipetu
Kádinky	Svorky střední
Odměrná baňka	Laboratorní stojan
Titrační baňka	Špachtle
Odměrný válec (50 ml, 100 ml)	Lžička
Byreta s přímým kohoutem	Váženky
Nedělené skleněné pipety (5 ml, 10 ml)	Míchadla
Dělená skleněná pipeta (5 ml)	Elektromagnetická míchačka
Skleněná nálevka malá	

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Thiosíran sodný	Jód
Uhličitan sodný	Jodid draselný
Škrob	Vitamínový doplněk stravy
Kyselina sírová	

POSTUP:

1) PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

A. *Příprava 100 ml odměrného roztoku thiosíranu sodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ($M_r=248,17$) o koncentraci $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$*

1. Vypočtete navážku thiosíranu sodného potřebnou k přípravě 100 ml roztoku o koncentraci $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.
2. Na předvážkách navažte vypočítané množství thiosíranu sodného.
3. Pro stabilizaci roztoku přidejte špetku uhličitanu sodného.
4. Rozpusťte obě látky v 80 ml destilované vody za stálého míchání.
5. Roztok poté přelejte do 100 ml odměrné baňky a doplňte po rysku destilovanou vodou.

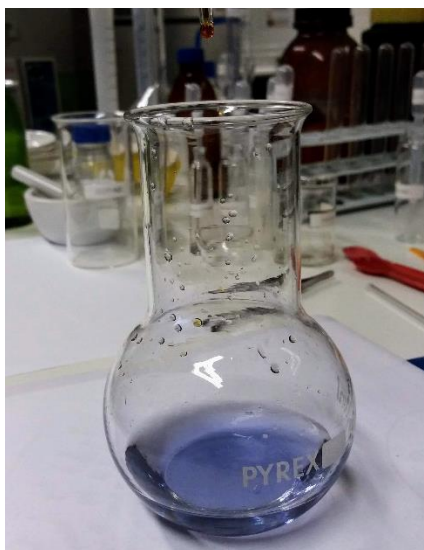
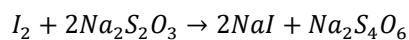
B. *Příprava škrobového mazu*

1. Navažte 0,1 g škrobu a rozmíchejte jej v 50 ml destilované vody.
2. Roztok 5 min považte na vařiči, až bude roztok čirý.
3. Nechte roztok 10 min zchladnout.

2) STANDARDIZACE ROZTOKU JÓDU

1. Do titrační baňky odměřte 20 ml roztoku thiosíranu sodného.
2. Napipetujte 5 ml roztoku škrobového mazu.
3. Do skleněné byrety nalijte odměrný roztok jódu.
4. Opatrným povolením kohoutu korigujte hladinu odměrného roztoku po rysku.
5. **Titrujte po kapkách do modrého zbarvení (Obr. 4), opakujte 2x, запиšte si spotřebu jódu.**

6. Vypočítejte přesnou koncentraci jódu ze znalosti rovnice:



Obr. 4: Modré zbarvení jako výsledek titrace roztoku thiosíranu roztokem jódem s využitím škrobu jako indikátoru.

3) JODOMETRICKÉ STANOVENÍ VITAMÍNU C

Pozn.: V této úloze je možné stanovit obsah vitamínu C (kromě tablet, které jsou k dispozici) i ve vámi dodaném vzorku (pokud možno průhledném a světlém, ne modrém) jako jsou šťávy, sirupy, potravinové doplňky, apod. V kádince připravte jeden roztok ke stanovení vitamínu C tak, že finální předpokládaná koncentrace bude přibližně 100 mg ve 100 ml destilované vody. Přidejte 10 ml roztoku 10% kyseliny sírové.

1. Do titrační baňky odměřte 25 ml vašeho připraveného roztoku vitamínu C.
2. Napipetujte 5 ml roztoku škrobového mazu.
3. **Titrujte po kapkách do modrého zbarvení, opakujte 2x, zapište si spotřebu jódu.**

ÚKOL Č. 2: Důkaz přítomnosti vitamínu C

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Skleněné zkumavky
Stojany na zkumavky

Hrnc
Vařič

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Vitamínový doplněk stravy
Dusičnan stříbrný

Fehlingovo činidlo I a II
Amoniak

POSTUP:

1) Důkaz redukcí stříbrných iontů

Vitamín C je silné redukční činidlo, a proto lze prokázat zjištěním přítomnosti jím vyredukované látky jako například vyredukovaného elementárního stříbra z roztoku dusičnanu stříbrného.

1. Do dvou skleněných zkumavek přidejte pomocí Pasteurovy pipety 3 ml roztoku dusičnanu stříbrného a přidejte 5 kapek amoniaku.
2. K první zkumavce přidejte 2 ml roztoku vitamínu C. Pozorujte sraženinu - stříbro je patrné jako perleťová až černá sraženina (Obr. 5) a pokud nevzniká hned, zkumavku zahřejte na vroucí vodní lázni po dobu 10 min.

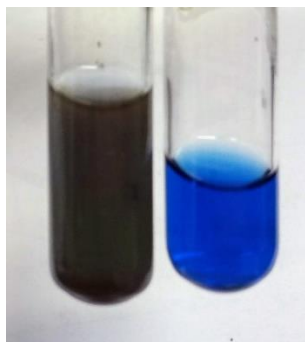


Obr. 5: Kontrolní reakce dusičnanu stříbrného (vlevo) a sraženina redukováného stříbra vitamínem C (vpravo).

2) Důkaz Fehlingovým činidlem

Při vzniku Fehlingova činidla dochází nejprve k reakci mezi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a NaOH , kdy vzniká světle modrá sraženina hydroxidu měďnatého, která je v nadbytku rozpustná za vzniku vínanu měďnatého. Redukční účinky kyseliny askorbové dokážeme reakcí s Fehlingovým činidlem, kdy dochází k oxidaci kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou a zároveň k redukcí Cu^{2+} na Cu^+ (konkrétně na Cu_2O , který má oranžovou barvu).

1. Do dvou skleněných zkumavek pipetujte pomocí Pasteurovy pipety 1 ml roztoku Fehlingova činidla I a 1 ml roztoku Fehlingova činidla II.
2. K jedné ze zkumavek přidejte 2 ml roztoku vitamínu C.
3. Zkumavku zahřívejte na vroucí vodní lázni po dobu 10 min, pozorujte vyloučenou sraženinu (Obr. 6).



Obr. 6: Pozitivní reakce vitamínu C s Fehlingovým činidlem (oranžová sraženina na dně) a negativní kontrola (pouze Fehlingovo činidlo).

VYHODNOCENÍ:

1. Uveďte výsledky důkazových reakcí vit. C.
2. Vypočítejte množství vitamínu C ($M = 176 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) v jedné tabletě vitamínového doplňku stravy případně ve vašem vzorku a porovnejte s údajem uváděným výrobcem.

10. Základy práce s mikroskopem

Světelná mikroskopie

Světelná mikroskopie je základní metodou pozorování ve všech biologických oborech, jejichž předmětem je buňka (tkáň, pletivo, mikroorganismus), protože rozlišovací schopnost této metody odpovídá velikosti buněk a mnohých organel. Světelná mikroskopie využívá k zobrazení světelných paprsků (elektronová mikroskopie proudy elektronů).

Podle osvětlení objektu se rozlišuje:

- mikroskopie v procházejícím světle (světlo prochází pozorovaným objektem);
- mikroskopie v dopadajícím světle (světlo dopadá shora na povrch objektu).

Patří sem **mikroskopie**:

- ve světelném poli;
- v temném poli;
- fázově kontrastní;
- interferenční;
- polarizační;
- fluorescenční;
- v neviditelných paprscích (UV, RTG, IČ).

Podle osvětlení okolí objektu rozlišujeme:

- mikroskopie ve světelném poli (zobrazený objekt má tmavý obrys a nalézá se ve světelném zorném poli). Tato metoda je základní a užívá se nejběžněji.
- mikroskopie v temném poli (světlý objekt je v černém - temném poli). Užívá se pro zvláštní případy.

Složení světelného mikroskopu (obr. 1)

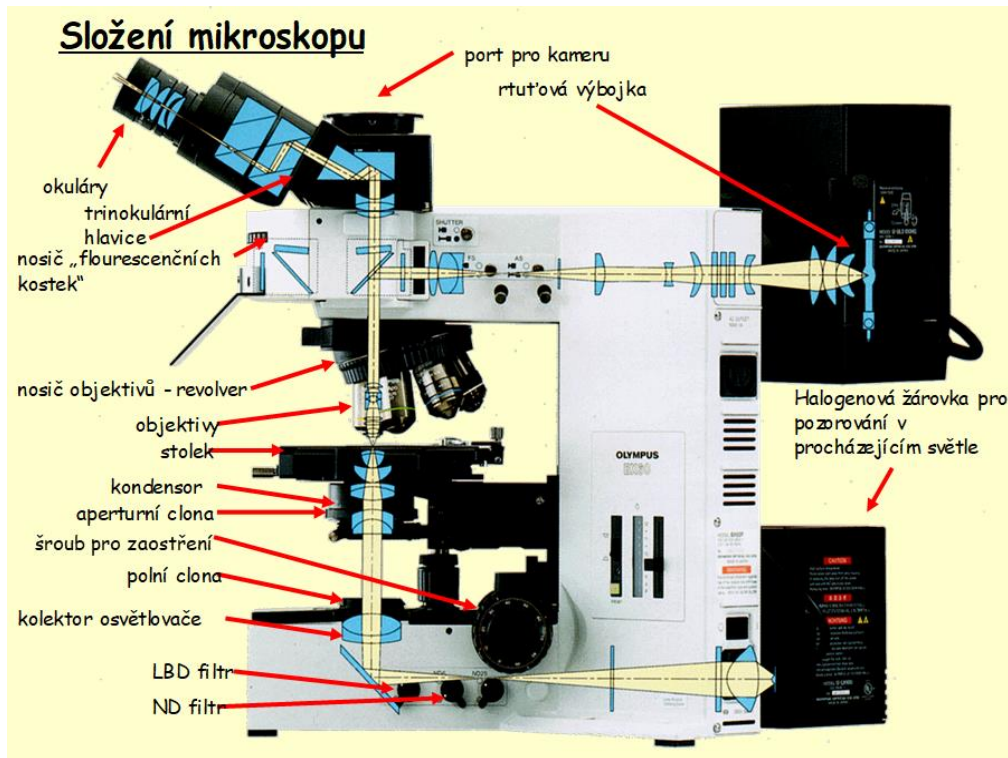
Mechanické díly: stativ, noha stativu, šroub pro hrubé a jemné zaostření, stolek mikroskopu, vodič preparátu, revolverový měnič objektivů, objímka pro kondenzor, objímka pro filtr. U starých mikroskopů úchytka pro zrcátko, pružinky pro přidržení preparátu.

Optické díly: objektivy, okuláry, kondenzor s aperturní irisovou clonou. U starých mikroskopů zrcátko.

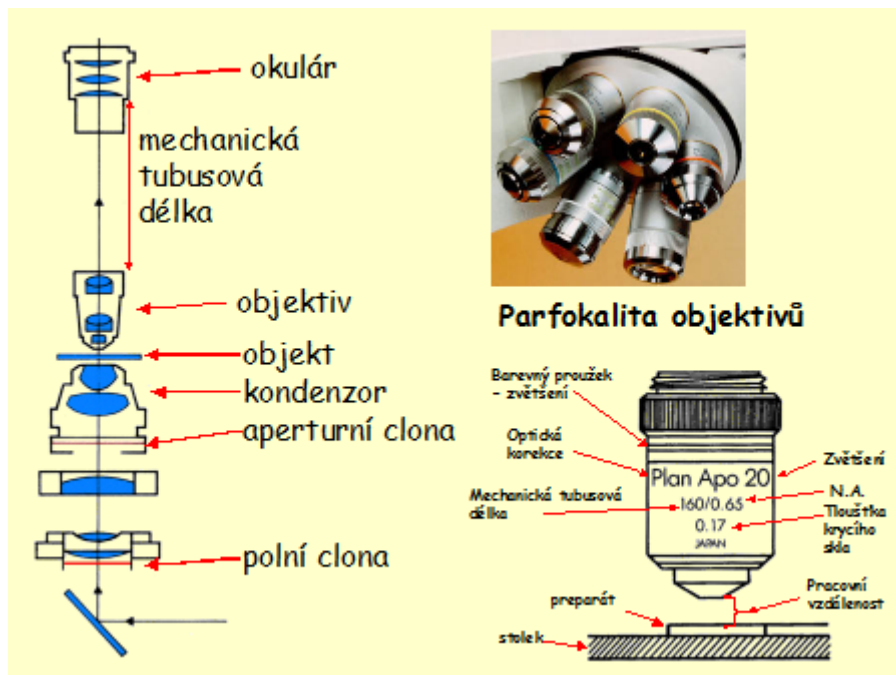
Osvětlovací zařízení: lampa v noze stativu s kolektorovou čočkou. Staré mikroskopy samostatnou mikroskopickou lampu.

Clony: pod kondenzorem aperturní irisová clona, dále plní clona.

Objektiv je základní optický prvek mikroskopu (Obr. 2). Vytváří zvětšený převrácený obraz předmětu v horní ohniskové rovině objektu. Tento obraz zvětšuje okulár. Zvětšený obraz je registrován oční sítnicí nebo fotografickým filmem.



Obr. 1: Binokulární mikroskop.



Obr. 2: Objektiv.

Číselná apertura

Rozlišovací schopnost objektivu je vyjádřena jeho číselnou (numericou) aperturou A (apertura = lat. otvor):

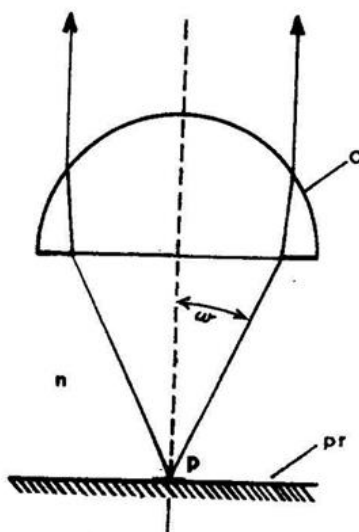
$$A = n \cdot \sin \omega$$

kde: n ... index lomu prostředí mezi objektivem a preparátem (pro vzduch je $n = 1$, pro imerzní olej a sklo $n = 1,5$)

ω ... poloviční otvorový úhel, tedy polovina úhlu, který svírají protilehlé krajní paprsky vycházející z předmětového bodu (P) na optické ose mikroskopu a vstupující ještě do objektivu (O) – předmětovým bodem se rozumí kterýkoliv bod či strukturu mikroskopického objektu (Obr. 3).

Číselná apertura objektivu má velký praktický význam:

- Určuje rozlišovací schopnosti a hranice užitečného zvětšení.
- Ovlivňuje světelnost mikroskopického obrazu: světelnost obrazu je přímo úměrná čtverci A a nepřímo zvětšení objektivu
- Ovlivňuje hloubku ostrosti. Snížením A objektivu se zvětšuje tloušťka zobrazené vrstvy preparátu. Objektivy s velkou hodnotou A mají malou penetrační (pronikací) schopnost, zobrazují velmi tenkou vrstvičku. Pro svůj zásadní význam je údaj A uveden na každém objektivu vedle údaje zvětšení.



Obr. 3: Číselná apertura (A) objektivu závisí na velikosti otvorového úhlu (2ω) a na indexu lomu (n) média mezi objektem (P) v preparátu (pr) a čelní čočkou objektivu (O). Paprsky vystupující z bodu P pod úhlem větším než 2ω by se do objektivu nedostaly.

Poznatky pro subjektivní mikroskopii lze souhrnně vyjádřit pojmem rozlišivost mikroskopu (d_m). Veličina d_m informuje o tom, jaké nejmenší rozměry musí mít předmět, abychom jej při určitém celkovém zvětšení mikroskopu dobře rozlišili svými očima. Vypočítá se podle vzorce:

$$d_m = \frac{327 \mu\text{m}}{M}$$

kde: d_m ... minimální velikost předmětu v μm ;
327 μm ... vzdálenost dvou bodů, které průměrně unavené oko rozliší jako dva body ze vzdálenosti 250 mm;
M ... celkové zvětšení mikroskopu

$$M = M_{\text{objektivu}} \cdot M_{\text{okuláru}} \cdot \text{zvětšovací koeficient tubusu}$$

kde: zvětšovací koeficient tubusu je roven 1 při dodržení předepsané tubusové délky mikroskopu

Při subjektivním mikroskopování je celkové zvětšení voleno tak, aby hodnota rozlišivosti (d_m) odpovídala velikosti objektu.

Základní pravidla mikroskopování

1. Do optické osy mikroskopu nastavíme objektiv o nejmenším zvětšení (většinou 4x).
2. Osvětíme zorné pole a upravíme rozestup okulárů.
3. Zkontrolujeme čistotu optiky.
4. Položíme na stůl preparát a upevníme ho. Otáčením makrošroubu posouváme stůl s preparátem nahoru směrem k objektivu a pozorováním zorného pole vyhledáváme daný objekt.

Pozor! Nemáme-li nastavený nejmenší objektiv, může se stát, že při posouvání stolku směrem vzhůru a hledání objektu, narazíme preparátem do objektivu a ten se poškodí!

5. Ověříme, zdali vidíme oběma očima (okuláry) stejně dobře.
6. Makrometrickým šroubem zachycený obraz zaostřujeme, šroubem mikrometrickým už jen jemně doostřujeme.
7. Pohybujeme preparátem a pátráme po nejvhodnějším místě pro pozorování. Toto místo posuneme doprostřed zorného pole.
8. Pro vlastní mikroskopování vyměníme objektiv podle potřeby za jiný a zkontrolujeme nastavení vhodné apertury. K zaostření pak již stačí mikrometrický šroub.
9. Po nastavení potřebného zvětšení upravíme vhodně intenzitu světla a kontrast ovládním clony, případně kondenzoru.
10. Při vlastním studiu preparátů jemně pohybuje mikrometrickým šroubem a tak zaostřujeme různé roviny v preparátu. Pravou rukou můžeme kreslit.
11. Po ukončení práce s mikroskopem, uvedeme přístroj do základní klidové polohy, tj. stůl pro preparát umístíme do nejspodnější polohy a nastavíme objektiv s nejmenším zvětšením.

Formy zobrazení mikroskopických objektů jsou v podstatě čtyři: kresba, mikrofotografie, mikrokinematografický záznam a videozáznam. Kterákoliv z uvedených forem může být v černobílém nebo barevném provedení.

Údržba mikroskopu

Čistění optických částí se provádí vatovými tampónky nebo papírky na optiku stíráním ze středu směrem na periferii nebo ze středu po spirále. Lze použít komerčně prodávané prostředky na čistění optiky nebo směs isopropanol:destilovaná voda (1:1) + kapka 1% roztoku dodecylsírany sodného (SDS). Čistící směs se nesmí nikdy aplikovat přímo na optiku, ale pouze zvlhčit čistící materiál. Nikdy se nesmí používat korosivní látky a rozpouštědla. Prach se odstraňuje ofukováním balónkem. Z mechanických částí se prach odstraňuje jemným štětečkem.

Mikroskopický preparát a objekt

Mikroskopický preparát se skládá z podložního skla a krycího skla, mezi skly je médium, v němž je uložen objekt. Preparát je zvedán zásadně za hrany. Preparáty typu krevního nátěru se mohou pozorovat bez krycího skla. Dobře připravený preparát je předpokladem dobrého zobrazení objektu.

Mikroskopické preparáty se dělí na:

- čerstvé – dočasné (nativní)
- trvalé (pracuje se s materiálem usmrceným, fixovaným, konzervovaným)

Čerstvé preparáty umožňují pozorovat pohyb a činnost celých buněk nebo organel. Nevýhodou je omezený výběr materiálu a časové omezení. K přípravě čerstvých preparátů jsou vhodné izolované buňky, části tkání a drobnohlední živočichové. Preparáty prohlížíme ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku. Fyziologická media jsou:

- přirozená – krevní sérum, amniová tekutina
- umělá – fyziologický roztok, Ringerův roztok aj.

U čerstvých preparátů je často používáno tzv. vitální barvení, které se rozlišuje na:

- intravitální barvení – barvení živých, zcela neporušených buněk (př. prvoci)
- supravitální barvení – barvení přežívajících buněk vyňatých z těla
- postvitální barvení – barvení odumírajících buněk

Příprava čerstvého preparátu

Do středu podložního sklíčka je kapátkem přenesena kapka vody nebo jiného media, do ní se štětečkem, preparační jehlou nebo pinzetou vloží připravený vzorek. Byla-li kapka malá, proniká vzduch pod krycí sklíčko, ten se odstraní přikápnutím vody (media) těsně k okraji krycího sklíčka. Naopak, je-li vody pod krycím sklíčkem více a objekt se pohybuje, je třeba přebytečnou vodu odsát filtračním papírem. Dostane-li se voda na svrchní stranu krycího sklíčka, je nutné zhotovit nový preparát.

Krycí sklíčko se pokládá vždy nejdříve šikmo na hranu a pak se zvolna spouští na objekt!!!

Příprava trvalého preparátu

Trvalý preparát je uzavřen do tzv. uzavíracího média, kterým je nejčastěji kanadský balzám. Před uzavřením se musí preparát odvodnit a to řadou alkoholů o vzestupné koncentraci. Trvalé preparáty umožňují nejen lépe rozlišit jednotlivé struktury, ale především slouží jako dokladový nebo demonstrační materiál.

Příprava tenkých řezů

K přípravě tenkých řezů je použito speciálních mikrotomů (Obr. 4). Nejjednodušší ruční mikrotom je tvořen dutým válcem na horním konci opatřeným černým hladkým stolcem, na spodním otáčivou hlavicí mikrometrického šroubu, který ve svislém směru pohybuje svorkou umístěnou uvnitř válce. Do ní se pomocí bočního šroubu upevní objekt, který se řeže. Objekty se řežou břitvou. Mokřým štětečkem se řezy přenášejí do vody (média).



Obr. 4: Typy mikrotomů.

Specifická barvení preparátů

U mikroskopických pozorování je časté specifické barvení preparátů, které pomáhá zviditelnit buněčné struktury nebo orgány. Kromě již zmíněného vitálního barvení se používá celá škála barviv, které se dělí podle náboje, způsobu barvení nebo specifity vůči buněčným strukturám. Nejčastěji používanou skupinou jsou barviva specifická vůči buněčným jádrům, jako např. toluidinová modř, kterou budete používat v úloze 11. (Mikroskopie a buněčný cyklus) k vizualizaci fází buněčného cyklu.

ÚKOL Č. 1: Stavba rostlinné buňky, plasmolýza, deplasmolýza, plasmoptýza

Buňky z pokožky cibule jsou v jednom směru protáhlé, mají velkou centrální vakuolu. Buněčná stěna je stejnoměrně silná a mezibuněčné prostory nejsou vyvinuty, což souvisí s krycí funkcí pokožkových buněk. Jádro se nachází při buněčné stěně a je bochníkovitého tvaru.

V hypertonickém prostředí dochází u buněk k tzv. plasmolýze, která je způsobena tím, že voda je z vakuol odsávána. Vakuola se zmenšuje a cytoplasma se odchlipuje od buněčné stěny. Po přidání destilované vody dochází k deplasmolýze, buňka se nachází v hypotonickém prostředí. Voda vniká do vakuoly, která se zvětšuje a cytoplasma se dostává do původní polohy. Po déle trvajícím pozorování mohou buňky praskat a červenofialový obsah vytéká do okolní vody. Vlivem velkého osmotického tlaku dochází k prasknutí cytoplazmatické membrány i buněčné stěny a nastává plasmoptýza.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Světelný mikroskop
Podložní sklíčka
Krycí sklíčka
Pasteurovy pipety
Žiletka
Pinzeta

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Cibule se zbarvenými suknicemi (v buněčné šťávě obsahují antokyan)
Roztok sacharosy o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

POSTUP:

1. Nařežte si několik čtverečků pokožky (asi 5 x 5 mm) přímo na suknicu tak, že ostrou žiletkou provedete nehluboké zářezy.
2. Pinzetou sloupnete vyříznuté čtverečky pokožky, které rychle přenesete na podložní sklo do kapky vody nebo do kapky roztoku sacharosy.
3. Pozorovaný objekt překryjte opatrně krycím sklíčkem. Pozorujte stavbu rostlinné buňky v kapce vody a následně změny v roztoku sacharosy.
4. Po ukončení pozorování pletiva v roztoku sacharosy přikápněte na jednu stranu krycího sklíčka kapku vody a k druhé straně přiložte proužek filtračního papíru, který vysaje z prostoru pod krycím sklem roztok sacharosy. Tento úkon několikrát zopakujte. Pozorujte.

VYHODNOCENÍ:

1. Popište a zakreslete tvar buněk pokožky cibule v izotonickém prostředí.
2. Zakreslete a popište vliv roztoku sacharosy na pokožkové buňky cibule.

ÚKOL Č. 2: Charakterizace jednoděložných a dvouděložných rostlin

A. Pozorování průduchů

Průduch (stoma, mn. číslo stomata) je struktura vyskytující se především na listech vyšších rostlin, která umožňuje transpiraci a kontrolovanou výměnu plynů (především CO_2 a O_2) mezi mezofylem listu rostliny a ovzduším. Jsou tvořeny dvěma svěřacími buňkami uzavírajícími průduchovou štěrbinu. Pod průduchovou štěrbinou je v mezofylu dýchací dutina. Svěřací buňky mají nejčastěji ledvinovitý tvar a kromě výrazné vakuoly obsahují i chloroplasty. Otvírání a zavírání štěrbin je vyvoláno osmotickými stahy svěřacích buněk a je ovlivněno koncentrací osmoticky aktivních látek, hladinou enzymů a hormonů, světlem a obsahem vody v rostlině. Existuje však několik modelů průduchů lišících se anatomickou stavbou a mechanismem pohybu svěřacích buněk. Taktéž velikost a počet průduchů je značně variabilní a souvisí s polohou a vnějšími podmínkami. Obvykle jsou průduchy vyvinuty ve větším zastoupení na spodní straně listu, u jednoděložných rostlin jsou rozmístěny na obou stranách stejnoměrně (Obr. 5). Na pozorování průduchů se připravuje tzv. otiskový preparát pokožky listu vytvořený pomocí bezbarvého laku.



jednoděložná rostlina



dvouděložná rostlina

Obr. 5: Průduchy na listech jednoděložných a dvouděložných rostlin.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Světelný mikroskop
Podložní sklíčka
Pinzeta
Lepicí páska

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

List semenáčků hrachu, kukuřice či fazolu
Bezbarvý lak na nehty

POSTUP:

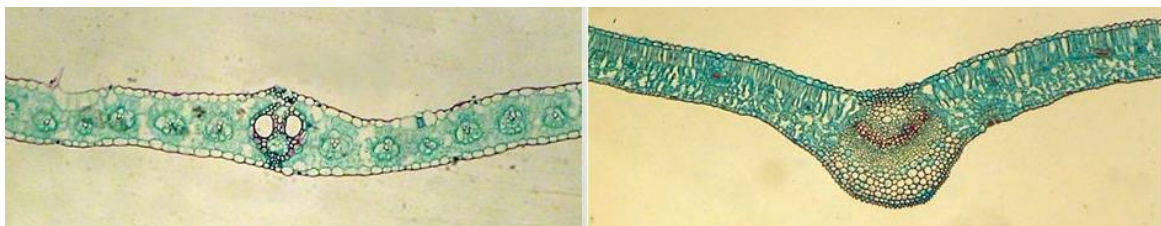
1. Uřízněte jeden list semenáčků hrachu, kukuřice.
2. Na spodní i vrchní stranu listu obou rostlin naneste tenkou vrstvu bezbarvého laku a nechte ho uschnout.
3. Následně nalepte lepicí pásku na zaschlý lak, jemně přitlačte tak, aby se lak zachytil na pásku, pak ji odlepte a přeneste na podložní sklíčko. Pozorujte.

VYHODNOCENÍ:

1. Zakreslete a popište svá pozorování. Potvrdili jste rozdíly v rozložení a v počtu průduchů na listech jednoděložných a dvouděložných rostlin?
2. Bylo uspořádání průduchů paralelní nebo nepravidelné? Pozorovali jste rozdíly v anatomii svěracích buněk?

B. Pozorování rostlinných pletiv a cévních svazků listu

Na povrchu listu je pokožka (epidermis) tvořená plochými buňkami (tzv. epidermální buňky). Vnější stěna je krytá kutikulou. Základní pletivo listu je mezofyl (Obr. 6). Ten je v listu rozčleněn na palisádový parenchym a houbový parenchym. U listů monofaciálních je mezofyl tvořen palisádovým parenchymem vyskytujícím se na obou stranách a uprostřed je houbový parenchym. U listů bifaciálních se jedno až vícevrstevný palisádový parenchym nachází na svrchní straně pod epidermis, je tvořen válcovitými, protáhlými buňkami těsně k sobě naléhajícími a obsahuje velké množství chloroplastů. Houbový parenchym obsahuje méně chloroplastů, je tvořen laločnatými buňkami a vytváří mezibuněčné prostory zajišťující dostatečný rozvod plynů a vody.



Obr. 6: Rostlinná pletiva na příčném řezu listu.

Zdroj: <https://slideplayer.com/slide/10561918/>.

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Světelný mikroskop
Podložní sklíčka
Krycí sklíčka
Pinzeta

Ruční mikrotom
Žiletka
Štěteček

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

List semenáčků hrachu, kukuřice
Mrkev

POSTUP:

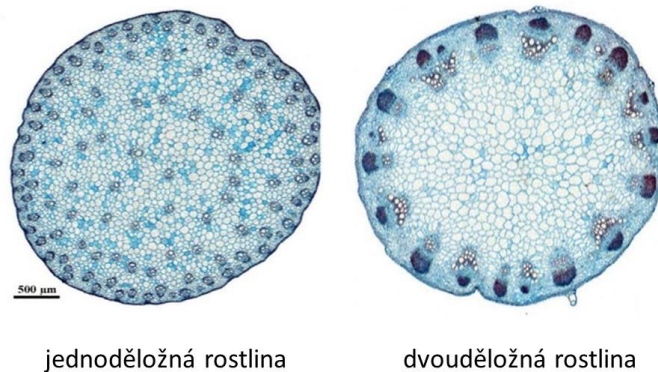
1. Uřízněte asi 3cm špalíček mrkve (použijte korkovrt velikosti 6) a nařízněte jej asi do poloviny délky špalíčku. Do zářezu vložte příčně odřezaný kousek listu semenáčků hrachu, resp. kukuřice, a mrkev se segmentem upněte do ručního mikrotomu.
2. Žiletkou připravte co nejtenčí příčné řezu listu, které vložíte do kapky vody na podložním sklíčku, překryjte je krycím sklíčkem a pozorujte mikroskopem.

VYHODNOCENÍ:

1. Zakreslete a popište svá pozorování. Jak se lišilo rozložení rostlinných pletiv v listech hrachu a kukuřice?
2. Na základě svého pozorování popište, jak se lišilo rozložení cévních svazků v listech rostlin.

C. Pozorování uspořádání cévních svazků ve stonku rostliny

Lignifikace je proces, při kterém se do celulózní kostry buněčné stěny ukládá lignin. K nejznámějším histochemickým reakcím, které umožňují identifikovat lignin, patří například reakce s floroglucinolem. Tyto reakce nejsou pro lignin specifické, nýbrž jsou reakcemi uvedených činidel s koniferylaldehydem a jinými příbuznými látkami, které jsou stavebními kameny ligninu. Zdrěvnatělé buněčné stěny obsahující lignin se na řezu zbarví červeně až červenofialově.



Obr. 7: Uspořádání cévních svazků ve stonku rostlin.

Zdroj: <http://vsangiosperm.weebly.com/xylem-and-phloem.html>

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Světelný mikroskop
Podložní sklíčka
Krycí sklíčka
Pinzeta

Kapátko
Ruční mikrotom
Žiletky
Štěteček

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Stonky semenáčků hrachu, kukuřice či fazolu
Mrkev
Floroglucinolové činidlo
75% roztok glycerolu v 10% kyselině sírové
25% kyselina chlorovodíková

POSTUP:

1. Uřízněte asi 3cm špalíček mrkve (použijte korkovrt velikosti 6) a nařízněte jej asi do poloviny délky špalíčku. Rukojetí špachtle do jejího středu udělejte žlábek. Do žlábků vložte 1,5 cm část stonku (segment) a mrkev se segmentem upněte do ručního mikrotomu.
2. Žiletkou připravte co nejtenčí příčné řezy, které vložíte do vody.
3. Následně řezy přeneste štětečkem do několika kapek floroglucinolu v Petriho misce.
4. K řezům v misce přikápněte 1 kapku 25% HCl a nechte 2-5 minut působit.
5. Vybarvené řezy přeneste do roztoku glycerolu v kyselině sírové na podložním skle, překryjte krycím sklíčkem a pozorujte mikroskopem.
6. Pro kontrolu si nechejte několik řezu jen ve vodě a porovnejte s nabarvenými řezy.

VYHODNOCENÍ:

1. Zakreslete a popište svá pozorování.
2. Pojmenujte buňky, u kterých byla prokázána přítomnost ligninu.

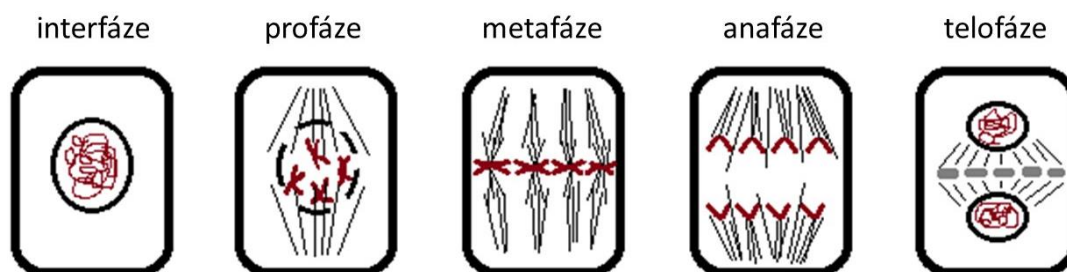
11. Mikroskopie a buněčný cyklus

Buněčný cyklus

Genetická informace každého organismu je uložena v několika (příp. mnoha) molekulách DNA (deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina) neboli **chromosomech**. Například lidské buňky obsahují po 46 chromosomech, zatímco buňky cibule po 8 chromosomech. Sled pochodů, při kterých každá **buňka zdvojnásobí svůj obsah**, včetně genetického materiálu a rozdělí se na dvě dceřiné buňky, se nazývá buněčný cyklus.

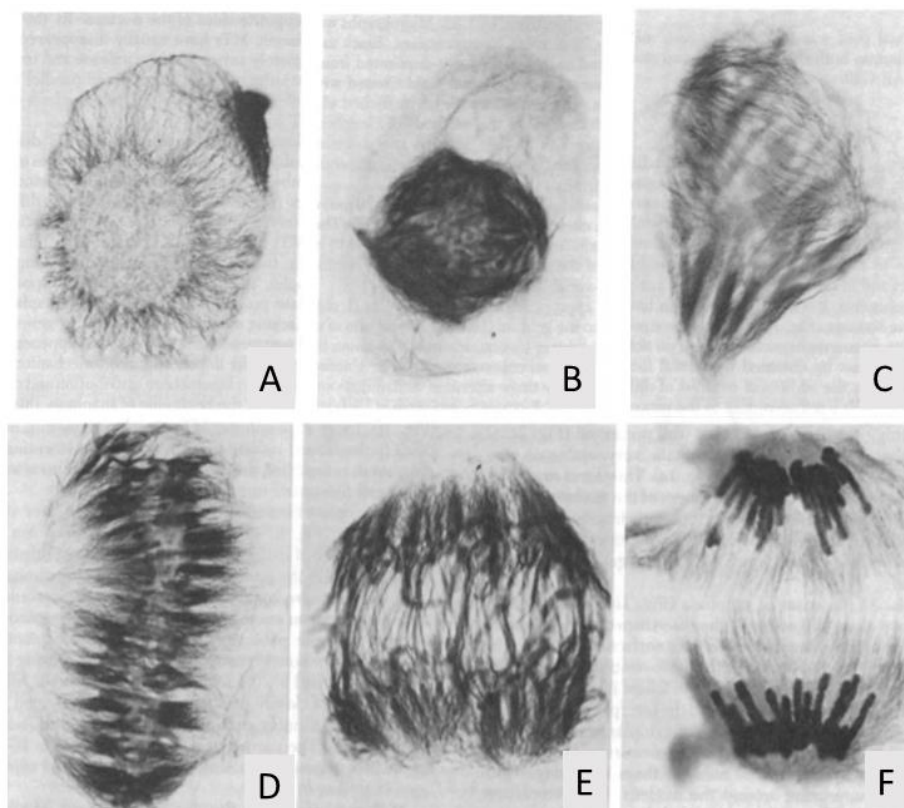
Buněčným cyklem je nazván sled pochodů v buňce od skončení jedné mitózy do konce mitózy následující. Během buněčného cyklu buňka znásobuje svůj obsah DNA dvakrát a zdvojuje svou cytoplazmu včetně organel. Po rovnoměrném rozdělení jádra a jeho obsahu (mitóza) dochází k samotnému fyzickému oddělení buněk, kdy je mezi nově vznikající buňky rozdělena cytoplazma a organely (cytokineze). **Mitóza a cytokineze** tvoří dohromady tzv. **mitotickou fázi** (M-fáze) buněčného cyklu. Zbylá část buněčného cyklu se nazývá jako **interfáze**. Označení pochází z doby, kdy rozlišení pro pozorování buněk nebylo veliké a kromě syntézy DNA a samotného dělení nebylo během buněčného cyklu nic vidět. Dnes je již známo, že je buňka metabolicky aktivní během celé interfáze, kdy dochází k syntéze např. nukleotidů a histonů pro replikaci DNA, stejně jako mnoha dalších proteinů i nízkomolekulárních látek. Trvání buněčného cyklu i poměr jednotlivých fází závisí na typu buňky a organismu.

Mitóza (M-fáze) má **4 hlavní fáze**: profázi, metafázi, anafázi a telofázi (Obr. 1) zakončená cytokinezí neboli samotným rozdělením buňky. Mezi profází a metafází je mezifáze nazývaná prometafáze.



Obr. 1: Stádia mitózy v rostlinných buňkách.

Trvání buněčného cyklu (tzv. **generační doba buňky**) je u různých buněk různá – závisí na typu buňky a na jejím fyziologickém stavu. Některé buňky se dělí několikrát za hodinu, jiné buňky se dělí v řádu dnů. U mnohobuněčných organismů bývá počet možných dělení výrazně omezen, velmi často se dělení zastaví v momentu, kdy buňka dosáhne určité specializace (typickým příkladem jsou buňky nervových tkání a buňky svalových vláken). Růst organismu a zvyšování počtu buněk zpravidla zajišťují kmenové buňky nebo meristémy.



Obr. 2: Stádia mitózy v buňkách endospermu rostliny *Haemanthus* (bělokvět). A – interfáze, B – profáze, C – prometáfáze, D – metafáze, E – anafáze, F – telofáze.

Zdroj: De Mey, J., Lambert, A. M., Bajer, A. S., Moeremans, M., & De Brabander, M. (1982). Visualization of microtubules in interphase and mitotic plant cells of *Haemanthus* endosperm with the immuno-gold staining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(6), 1898–1902. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.1898>

Interfáze

Interfáze je nejdelší fází buněčného cyklu (asi 90 % doby), biologická aktivita buňky je v této fázi velmi vysoká (období kontinuálního růstu buňky).

Interfáze se dělí na tři části: **G₁**, **S** a **G₂**. Během G₁-fáze (z angl. Gap = mezera) probíhá syntéza bílkovin, DNA polymerasy, syntéza RNA a tubulinu. Během S-fáze (syntetická fáze) je syntetizovaná DNA. Během G₂-fáze probíhá metabolická aktivita a růst buňky. Během G₁-fáze a G₂-fáze mohou buňky přecházet (reverzibilně) do klidové G₀-fáze (v G₂-fázi pouze rostlinné buňky, živočišné buňky v obou fázích).

Na konci interfáze se v buňce nachází jedno nebo více jadérek a její jádro je obklopeno **jadernou membránou**. U živočišných buněk se na vnější straně jádra nachází dva **centrozomy**, které byly duplikovány během interfáze a u živočichů obsahují dvojici **centriol**. Kolem centrozomů se nachází kruhová řada mikrotubulů (vzniklé polymerací tubulinu) nazývaná **astrosféra** (astery).

V této fázi ještě nelze jednotlivé chromozomy rozlišit mikroskopicky (viz Obr. 2A), protože jsou tvořeny tenkými poměrně volně spiralizovanými chromatinovými vlákny.

Mitóza (M-fáze)

Mitotické dělení se objevuje u eukaryot a je evoluční adaptací spojenou s problémem přesného rozdělení genetického materiálu jádra do dvou dceřiných buněk. Základní princip průběhu mitózy u eukaryot je obdobný, i když se může u různých organismů mírně lišit.

Jak již bylo zmíněno, mitóza se dělí do 4 fází s jednou mezifází (profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze), po mitóze probíhá vlastní dělení buňky (citokineze).

Frekvenci mitóz v živočišné tkáni nebo v rostlinném pletivu udává tzv. **mitotický index (MI)**, který je dán poměrem počtu buněk, které se nacházejí ve stadiu mitózy, k celkovému počtu buněk. Mitotický index odráží proliferační aktivitu tkáně nebo pletiva. Mitotický index závisí na délce trvání mitózy a na délce interfáze a zpravidla se udává v procentech dělících se buněk k celkovému počtu sledovaných buněk.

$$MI [\%] = \frac{M}{N} \cdot 100,$$

kde: M ... počet buněk v mitóze,
N ... počet všech buněk.

Profáze

Během profáze dochází k rozpadu endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu na menší fragmety, v jádru mizí jadérka. Chromozomová vlákna se více spiralizují (kondenzují) a vytvářejí jednotlivé chromozomy, které jsou již viditelné při pozorování světelným mikroskopem (Obr. 2B). Každý zdvojený chromozom je tvořen dvěma sesterskými chromatidami, které jsou propojeny po celé délce za pomoci proteinu kohezinu, každá chromatida nese specifickou oblast primární konstrikce – centromeru. V oblasti centromery vzniká na každé chromatidě chromozomu složitá proteinová struktura – **kinetochor**.

Na počátku profáze se od sebe oddělují centrozomy a pohybují se k opačným pólům buňky. Tyto slouží jako organizátory mikrotubulů, z nichž se tvoří **mitotické (dělící) vřetenko**. Některá vlákna dělícího vřetenka zasahují od jednoho pólu k ekvatoriální rovině buňky, kde se spojí a vytvoří tzv. polární vlákna. Centrozomy jsou pak označovány jako póly dělícího vřetenka.

Prometafáze

Ke konci profáze dochází k rozpadu jaderné membrány (Obr. 2C). Mikrotubuly dělícího vřetenka pak pronikají do oblasti jádra a spojují se s plně spiralizovanými chromozomy (kvarterní struktura chromozomu). Některá vlákna dělícího vřetenka pronikají až k chromozomům a připojují se na kinetochory v oblasti centromer za vzniku tzv. **kinetochorových vláken**. V buňce zůstávají i vlákna, která se nikam nepřipojují a tvoří tzv. astrosféru.

Metafáze

Během metafáze jsou centrozomy na protějších pólech buňky a určují **podélnou osu dělení**. Chromozomy se tahem kinetochorových vláken seskupí v ekvatoriální rovině buňky (tzv. **metafázní destička**) a centromery všech chromozomů jsou vyrovnané v řadě v metafázní destičce (Obr. 2D). Tato vlákna jsou vzhledem ke své funkci v anafázi označována jako tažná vlákna.

Metafáze je nejvhodnější fáze k určení počtu chromozomů a k jejich identifikaci.

Anafáze

Anafáze (Obr. 2E) je často nejkratším úsekem mitózy. Na počátku anafáze dochází k přerušení propojení mezi chromatidami za pomoci enzymu separasy (proteolytický enzym), jednotlivé chromatidy jsou pak tahem dělicího vřeténka posunuty k pólům buňky. Každá chromatida se stává samostatným chromozomem (dceřiný chromozom). Pohyb chromozomů k pólům buňky je zajištěn zkracováním, tedy depolymerací, kinetochorových vláken centromerou dopředu (anafáze A), současně se póly buňky od sebe vzdalují (anafáze B).

Na konci anafáze mají oba póly buňky stejné a úplné sestavy chromozomů.

Telofáze

Během telofáze (Obr. 2F) je buňka prodlužována polárními vlákny a u pólů buňky se začínají tvořit dceřiná jádra v místech shromáždění chromozomů, obnovuje se jaderná membrána z fragmentů membrány rodičovské buňky a ostatních částí endoplazmatického retikula, objevuje se opět jádérko a rozvolňují se chromatinová vlákna každého chromozomu.

Cytokineze

Dělení cytoplasmy a buňky za vzniku dvou dceřiných buněk následuje krátce po ukončení mitózy. U vyšších rostlin vzniká buněčná destička (fragmoplast) od středu k obvodu buňky (centrifugálně), u živočišných buněk se plasmatická membrána tvoří směrem z obvodu dovnitř buňky (centripetálně, zaškrčení, rýhování) za aktivní účasti mikrotubulů.

Mikroskopické pozorování chromozomů

Chromosomy nejsou v normálním světle viditelné, protože mají stejný lom světla jako cytoplasma. Je však možné je zviditelnit použitím specifických barviv nebo fázového kontrastu. Chromozomy se dobře barví pomocí **acetobarviv**, což jsou barviva rozpustná v kyselině octové nebo propionové – např. acetokarmín, laktopropionový orcein, acetonigrosin, lakmoid, atd.

Před barvením se nejprve provádí **fixace materiálu a macerace**, při které se rozruší střední lamela mezi buňkami, takže je pak možné preparát jemným tlakem rozložit do tenké vrstvy a není třeba ho řezat. Fixace se používá nejčastěji alkohol-octová (směs 96% ethanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1 – Farmerova fixáž), macerace se provádí často směsí koncentrované HCl a 96% ethanolu v poměru 1:1, případně 1M nebo 5M HCl, nebo pak enzymaticky působením pektinasy a celulas.

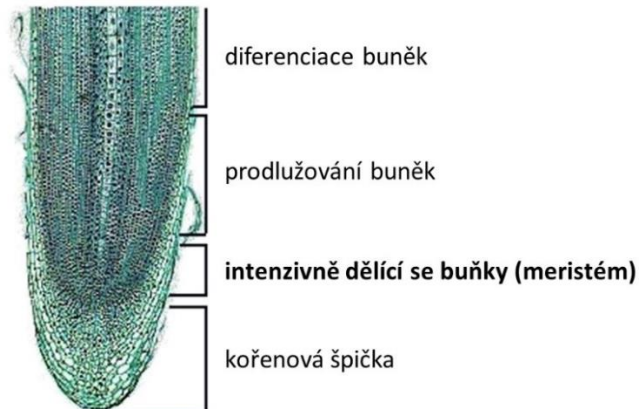
Barvením za pomoci acetobarviv se jasně vybarví chromatin a chromozomy, cytoplasma se zbarví do růžova.

Díky maceraci lze preparát jemným tlakem rozložit na tenkou vrstvu a připravit tak tzv. **roztlakový preparát**. Je vhodné vybrat materiál, kde dochází k intenzivnímu buněčnému dělení, jako jsou meristémy, které se nacházejí na vzrostném vrcholu stonku a v kořenové špičce (Obr. 3).

V případě, kdy je třeba chromozomy počítat, se před fixací provádí tzv. **předpůsobení** (nejčastěji roztoky kolchicinu, para-dichlorbenzenu, 8-hydroxychinolinu nebo studenou vodou). Předpůsobení zajistí rozrušení dělicího vřeténka, zkrácení chromozomů, chromatidy se od sebe neoddělují. Jednotlivé chromozomy jsou uvolněny z mitotického aparátu, tím jsou lépe rozloženy v celé buňce. Zvýší se počet pozorovaných metafází.

Pro přesnější identifikaci jednotlivých chromozomů (zvláště v metafázi) slouží metoda tzv. proužkování chromozomů (bandings), jejímž principem je diferenciální barvení chromatinu (vzniknou viditelné proužky, bandy).

Další možností barvení chromozomů je barvení dle Feulgena, díky jemuž se vybarví výhradně struktury obsahující DNA. Pomocí hydrolýzy v HCl se z DNA odštěpí purinové báze a na aldehydicke skupiny zbytků deoxyribosy se naváže barvivo – bazický fuchsin, obsažené v Schiffově reagensu.



Obr. 3: Podélný řez kořenovou špičkou.

ÚKOL Č. 1: Pozorování fází buněčného cyklu

LABORATORNÍ POMŮCKY:

Světelný mikroskop
Podložní sklíčka
Krycí sklíčka
Pasteurovy pipety
Preparační jehla
Žiletka
Pinzeta
Mikrozkumavky

CHEMIKÁLIE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL:

Kořenové špičky cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) nebo hrachu setého (*Pisum sativum* L.)
0,5% toluidinová modř nebo Schiffovo reagens
kyselina chlorovodíková o koncentraci $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

POSTUP:

Po celou dobu práce používejte ochranné rukavice!!!

1. Ustříhnete si asi 1 cm dlouhé kořínky cibule a vložte je do mikrozkumavky.
2. Přidejte $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl a nechte působit asi 10 minut při laboratorní teplotě.

- Opláchněte kořínky destilovanou vodou, jeden přeneste na podložní sklíčko a oddělte kořenovou špičku s meristemickým pletivem; zbytek kořene vyhodte.
- Kořenovou špičku přeneste pinzetou do kapky 0,5% toluidinové modře (Schiffovo reagens) na podložním sklíčku.
- Následně špičku opatrně přeneste do kapky destilované vody, poté kořenovou špičku přemístěte na nové podložní sklíčko, přiložte krycí sklíčko a kolmo přitlačte korkovou zátkou na špičku. Opatrně, abyste sklíčkem neposunuli nebo neotočili! Pozorujte roztlakový preparát pod světelným mikroskopem za využití znalostí získaných v úloze Základy mikroskopování.
- V 10 zorných polích mikroskopu spočítejte všechny buňky a buňky v mitóze.

VYHODNOCENÍ:

- Pozorujte preparáty a zakreslete.
- Pokud jste pozorovali buňky v rozdílných fázích mitotického dělení, označte, pojmenujte danou fázi do protokolu a stručně popište, co se děje s chromozomy.
- Výsledky z bodu 6 postupu запиšte do tabulky a stanovte mitotický index.

Zorné pole	Počet buněk				Počet všech buněk
	v profázi	v metafázi	v anafázi	v telofázi	
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
6					
10					
Celkem					