

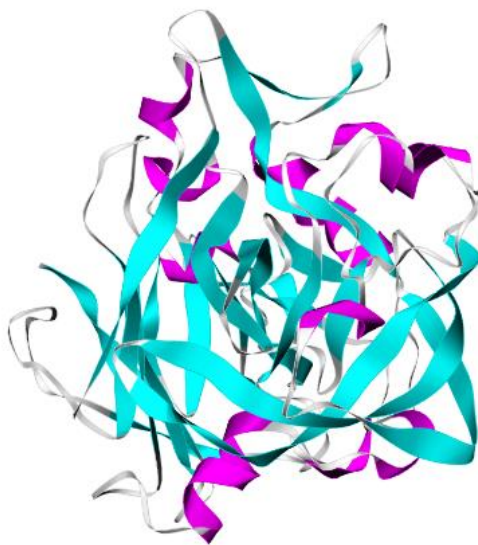
TRNAVSKÁ UNIVERZITA V TRNAVE

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

Návody na laboratórne cvičenia z biochémie

pre učiteľské kombinácie s chémiou

Martin Pipíška



Trnava 2021

© Trnavská univerzita v Trnave

© doc. RNDr. Martin Pipíška, PhD.

Recenzenti: prof. RNDr. Jana Sedláková, PhD.

doc. PaedDr. Katarína Kotuláková, PhD.

Trnava 2021

Za odbornú, jazykovú a štylistickú stránku týchto vysokoškolských skrípt zodpovedá autor.

ISBN 978-80-568-0229-8

Obsah

Predslov	3
Laboratórny poriadok a bezpečnosť a ochrana zdravia pri práci	4
Prvá pomoc pri úrazoch v laboratóriu	7
1. Základné zručnosti potrebné pre prácu v biochemickom laboratóriu	8
1.1 Váženie	8
1.2 Meranie objemu kvapalín – pipetovanie	8
Úloha 1. Pipetovanie destilovanej vody s kontrolou vážením	10
1.3 Spektrofotometria	13
Úloha 2. Meranie absorpčného spektra potravinárskych farbív	16
Úloha 3. Stanovenie koncentrácie neznámej vzorky a Lambert-Beerov zákon	20
1.4 Centrifugácia	23
2. Sacharidy	26
Úloha 4. Chemické vlastnosti sacharidov - kvalitatívne reakcie	29
Úloha 5. Separácia sacharidov tenkovrstvovou chromatografiou	32
Úloha 6. Stanovenie redukujúcich sacharidov metódou DNS	33
3. Aminokyseliny a proteíny	35
Úloha 7. Identifikácia aminokyselín v neznámej vzorke	36
Úloha 8. Stanovenie proteínov Lowryho metódou	42
4. Lipidy	44
Úloha 9. Stanovenie cholesterolu v olejoch	49
Úloha 10. Stanovenie peroxidového čísla tukov a olejov	50
5. Nukleové kyseliny	52
Úloha 11. Izolácia genómovej DNA z ovocia	54
Úloha 12. Izolácia RNA z kvasníc	55
Úloha 13. Izolácia DNA zo sleziny	55
Úloha 14. Dôkaz zložiek DNA a RNA	56
Úloha 15. Spektrofotometrické stanovenie nukleových kyselín	56
6. Enzýmy	59
Úloha 16. Určenie substrátovej špecificity sacharázy a α -amylázy	61
Úloha 17. Určenie optimálneho pH enzýmovej reakcie α -amylázy	62
Úloha 18. Určenie V_{max} a K_m enzýmovej reakcie	63
Príloha 1. Vzor laboratórneho protokolu	67
Použitá literatúra	69

Predslov

Predkladané skriptá sú určené študentom 3. ročníka bakalárskeho štúdia učiteľstva chémie v kombinácii na Pedagogickej fakulte TU. V úvodnej časti skriptá sumarizujú a vysvetľujú základné laboratórne techniky, postupy a zručnosti využívané v biochemickom laboratóriu (napr. práca s automatickou pipetou, spektrofotometria) a prinášajú úlohy na ich praktické precvičenie. Jadrom návodov na laboratórne cvičenia sú však úlohy venované jednotlivým biomolekulám – sacharidom, aminokyselinám, proteínom, lipidom, nukleovým kyselinám a enzýmom. Všetky úlohy sú navrhnuté a prakticky odskúšané tak, aby ich študenti stihli zrealizovať v rámci hodinovej dotácie určenej pre laboratórne cvičenie. Absolvovanie Laboratórných cvičení z biochémie umožní aj študentom učiteľských odborov prehĺbiť si teoretické vedomosti z predmetu Biochémia a získať praktické zručnosti nielen z oblasti základných biochemických metód, ale i s prácou s biologickým materiálom.

Ďakujem recenzentom prof. Jane Sedlákovej a doc. Kataríne Kotuľákovej za cenné rady a pripomienky, ktorými prispeli k skvalitneniu predkladaných návodov. Mgr. Dominike Koperovej a Mgr. Natálii Priškinovej, PhD. ďakujem za postrehy k realizácii navrhnutých úloh a finalizácii učebného textu.

Autor

Laboratórny poriadok a bezpečnosť a ochrana zdravia pri práci v Laboratóriu organickej chémie a biochémie PdF TU.

V Laboratóriu organickej chémie a biochémie sa vyskytujú špecifické riziká, a preto osoby prítomné v laboratóriu sú povinné dodržiavať bezpečnostné predpisy a chrániť svoje zdravie a zdravie ostatných prítomných osôb. Z tohto dôvodu sú povinní dodržiavať nasledujúce pokyny:

1. Študenti sú povinní sa zodpovedne pripraviť na každé laboratórne cvičenie. Pred cvičením si naštudujú teoretický úvod a návod k laboratórnemu cvičeniu, a musia poznať princípy realizovaných úloh.
2. Pri práci v laboratóriu sa študenti riadia písomnými alebo ústnymi pokynmi a môžu uskutočňovať iba predpísané experimenty. V prípade, že akákoľvek inštrukcia alebo jej časť nie je dostatočne zrozumiteľná, je študent povinný požiadať vyučujúceho o vysvetlenie.
3. Vstup do Laboratória organickej chémie a biochémie je povolený iba v prítomnosti vyučujúceho. Opustenie laboratória v priebehu cvičenia alebo po ukončení úlohy je možné iba s vedomím a súhlasom vyučujúceho.
4. Nedostatočná príprava na cvičenie, neznalosť bezpečnostných predpisov alebo nevhodné správanie počas laboratórneho cvičenia, môže byť dôvodom na vylúčenie študenta z praktického cvičenia.
5. Osoby, ktorých pozornosť alebo rozpoznávacie schopnosti sú alebo môžu byť ovplyvnené zdravotným stavom, užívanými liekmi, alkoholom alebo omamnými látkami, nesmú do laboratória vstupovať, ani sa v ňom zdržiavať.
6. V laboratóriu je zakázané jesť, piť a fajčiť. Rovnako je zakázané do laboratória nosiť akékoľvek potraviny a nápoje.
7. Pred každým odchodom z laboratória je potrebné si umyť ruky.
8. Pred vstupom do laboratória sa študenti musia preuť do vhodnej obuvi a obliecť si laboratórny plášť, ktorý musí byť vždy zapnutý. Študenti sú povinní počas laboratórneho cvičenia používať ochranné okuliare.
9. Neodporúča sa vstupovať do laboratória s kontaktnými šošovkami. Dlhé vlasy musia byť zopnuté gumičkou alebo sponkou. Pred vstupom do laboratória je potrebné odložiť z rúk prstene a iné ozdoby.
10. Do laboratória nesmú vstupovať tehotné ženy a osoby, ktoré by vzhľadom k svojmu zdravotnému stavu mohli byť ohrozené pobytom v laboratóriu, používanými chemikáliami alebo biologickým materiálom.
11. Každý študent má pridelené svoje pracovné miesto, na ktorom je povinný udržiavať poriadok a čistotu. Každý študent zodpovedá za používané prístroje a pomôcky. Stratú alebo poškodenie ihneď hlási vyučujúcemu.
12. Horúce alebo chemikáliami kontaminované pomôcky sa odkladajú na vopred určené miesto. Zátky reagenčných skúmaviek a baniek sa ukladajú na pracovný stôl tak, aby sa časti zasiahnuté reagensiami nedotýkali stola. Po použití je potrebné nádoby s reagensiami ihneď vrátiť na pôvodné miesto.
13. Do pracovných stolov je zakázané ukladať horľaviny a rozpracované práce, pri ktorých prebieha reakcia alebo sa predpokladá, že prebehnúť môže, pokiaľ nie je v pokynoch uvedené inak.
14. V prípade, že dôjde k rozliatiu, rozsypaniu alebo úniku akejkoľvek chemikálie alebo biologického materiálu, je študent povinný uskutočniť všetky opatrenia, aby zabránil škodám na zdraví, majetku a životnom prostredí a ihneď informovať vyučujúceho. To platí aj v prípade iných neočakávaných udalostí (vzplanutie materiálu, neočakávaná reakcia).

15. Pri rozliatí horľaviny je nutné okamžite zhasnúť kahan, zabezpečiť dôkladné vetranie a odstrániť horľavinu vsiaknutím do porézneho materiálu, ktorý sa likviduje ako nebezpečný odpad.
16. Rozliate kyseliny sa ihneď riedia vodou a spláchnu sa veľkým množstvom vody alebo sa odstránia vsiaknutím do inertného materiálu, ktorý sa likviduje ako nebezpečný odpad. Rozliate zásady sa spláchnu vodou alebo sa odstránia vsiaknutím do inertného materiálu, ktorý sa likviduje ako nebezpečný odpad.
17. Ostatné rozliate alebo rozsypané chemikálie sa likvidujú podľa pokynov vyučujúceho, ak nie je určené inak, spravidla sa zmetú alebo odsajú vhodným materiálom a likvidujú sa ako nebezpečný odpad. Zasiahnuté miesto sa dôkladne umyje vodou.
18. Rozbité sklo a odpad s ostrými hranami musí byť umiestnený do určených nádob.
19. Pri práci s koncentrovanými kyselinami, zásadami a niektorými organickými rozpúšťadlami sa používajú ochranné štíty na tvár. Dioptrické a ani ochranné okuliare nie sú dostatočnou ochranou.
20. Pri práci s biologickým materiálom a niektorými nebezpečnými látkami sa používajú jednorazové ochranné rukavice. V prípade znečistenia je potrebné rukavice ihneď vymeniť.
21. Je zakázané pipetovanie ústami.
22. Všetky práce s prchavými a dymiacimi látkami, a v určených prípadoch aj s ďalšími nebezpečnými látkami, je potrebné uskutočňovať v zapnutom digestore.
23. Testované vône alebo zápachy vzniknutých plynov je potrebné opatrne pohybom ruky priviať k nosu. Nesmie dôjsť k prudkému vdýchnutiu koncentrovaných plynov.
24. S kahanom a predmetmi, ktoré boli zahrievané (skúmavky, azbestová sieťka a pod.), je potrebné pracovať s veľkou opatrnosťou. Kahan nie je dovolené ponechať horieť bez dozoru. Ak dôjde k náhlemu zhasnutiu plameňa, je nutné okamžite uzavrieť prívod plynu, počkať na vychladnutie kahana a horák nastaviť. Horľaviny je zakázané ohrievať kahanom alebo na variči.
25. Skúmavka s roztokom sa zahrieva a pozoruje vždy s ústím odvráteným od tváre všetkých osôb v okolí.
26. Pri likvidácii roztokov po skončení pokusu je nutné dodržiavať predpisy a pokyny vyučujúceho. Roztoky, ktoré môžu byť vyliate do kanalizácie, je potrebné vždy dôkladne zriediť: vodné roztoky kyselín a zásad asi 1:30, ostatné s vodou miešateľné asi 1:10. Nebezpečné látky, ktoré sa nesmú vylievať do kanalizácie ani po zriedení, sa likvidujú ako nebezpečný odpad podľa pokynov vyučujúceho.
27. V prípade, že dôjde k úrazu, je potrebné okamžite poskytnúť prvú pomoc a udalosť a poskytnuté úkony bezodkladne ohlásiť vyučujúcemu.
28. Študentom je zakázané manipulovať s elektrickými prístrojmi a rozvodmi inak, ako je uvedené v pokynoch. Je zakázané pripájať neschválené prístroje. Študenti nesmú snímať kryty prístrojov a zariadení, a to ani v prípade, že kryt je možné odmontovať k realizácii užívateľskej údržby (výmena poistiek, žiaroviek a pod.).
29. Je nutné rešpektovať bezpečnostné štítky a piktogramy na prístrojoch, pomôckach a chemikáliách.
30. V prípade, že študent zistí alebo má podozrenie, že došlo k poškodeniu vybavenia laboratória spôsobom, ktorý ohrozuje zdravie a bezpečnosť osôb (unikajúci plyn, vniknutie tekutín do elektrických zásuviek, poškodenie izolácie elektrického vedenia), oznámi to okamžite vyučujúcemu. Ak by hrozilo nebezpečenstvo z omeškania, začne sám realizovať zodpovedajúce bezpečnostné opatrenia.
31. Po skončení práce študent umyje použité sklo a uloží ďalšie používané pomôcky na určené miesto. Pred odchodom z laboratória vyučujúci skontroluje pracovné miesto, používané prístroje a pomôcky.










Označenie nebezpečných chemikálií

Nebezpečné chemikálie v originálnych baleniach sa označujú výstražnými symbolmi, tzv. signálnymi slovami, a údajmi o nebezpečnosti podľa Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemikálií (GHS). Pokiaľ to prevádzkové a technické podmienky umožňujú, môže sa rovnaké značenie, prípadne jeho zjednodušený variant, použiť aj v študentskom laboratóriu.

Označenie chemikálie podľa GHS obsahuje:

1. výstražný symbol (pozri nižšie),
2. výstražné slovo „nebezpečenstvo“ (vyššie riziko) alebo „varovanie“ (nižšie riziko),
3. výstražné upozornenia (H-vety), ktoré obsahujú viac podrobností o nebezpečnosti,
4. pokyny pre bezpečné zaobchádzanie (bezpečnostné upozornenie), ktoré uvádzajú, ako s látkou bezpečne manipulovať.

Výstražných symbolov sa používa celkom deväť. Nasledujúca tabuľka uvádza ich opis zjednodušený pre potreby praktických cvičení:

	Výbušné látky
	Plyny pod tlakom
	Horľavé látky - patria sem hlavne látky, ktoré možno ľahko zapáliť, môžu vzplanúť pri ohreve alebo pri samovoľnej reakcii, ďalej látky a zmesi, ktoré sa môžu samovoľne zahrievať, môžu sa vznietiť pri styku so vzduchom, uvoľňujú horľavé plyny pri styku s vodou.
	Oxidujúce látky Samy o sebe nie sú horľavé, ale môžu reagovať predovšetkým s horľavými látkami a spôsobiť ich požiar, výbuch alebo môžu požiar zosilniť.
	Korozívne a žieravé látky Môžu vážne poškodiť kožu alebo oči.
	Toxické látky Pri požití, alebo v niektorých prípadoch pri vdýchnutí či styku s pokožkou, môžu spôsobiť akútne poškodenie zdravia alebo smrť.
	Dráždivé látky Např. látky spôsobujúce podráždenie kože, očí alebo dýchacích ciest, omamné látky a látky, ktoré majú iné škodlivé účinky na zdravie. Rovnakým symbolom sa označujú tiež látky poškodzujúce ozónovú vrstvu.
	Látky nebezpečné pre zdravie Týmto symbolom sa označujú např. látky karcinogénne, poškodzujúce plod alebo mutagénne. Ďalej sem patria látky, ktoré môžu poškodiť určitý orgán alebo ktoré vyvolávajú alergie, astmu alebo ochorenie dýchacieho systému.
	Látky nebezpečné pre životné prostredie Patria sem najmä látky poškodzujúce vodné ekosystémy.

Prvá pomoc pri úrazoch v laboratóriu

Vniknutie chemikálie do oka

Ak vnikne do oka akákoľvek chemikália alebo biologický materiál, je nutné okamžite oko vypláchnuť pomocou očnej sprchy alebo prúdom vodovodnej vody. Ak má postihnutý nasadené kontaktné šošovky, treba ich čo najskôr vybrať. Ďalší postup určí vyučujúci. Pri prvej pomoci sa nepoužívajú žiadne neutralizačné roztoky ani očné kvapky.

Poleptanie kože

Najskôr je potrebné odstrániť zasiahnutý odev, poleptané miesta je ihneď nutné dlhodobo oplachovať prúdom vody. V prípade ťažšieho poleptania zaistí ďalšie ošetrenie vyučujúci.

Popálenia

Postihnuté miesto je potrebné čo najrýchlejšie ochladiť studenou vodou. Na popálenú plochu sa neaplikujú žiadne masti ani lieky. Ďalšie ošetrenie zabezpečí vyučujúci.

Otvorené poranenia

Najprv je potrebné zastaviť krvácanie. Drobné rany (porezanie sklom) umyjeme prúdom vody, ďalšie ošetrenie (vrátane dezinfekcie a sterilného krytia) zabezpečí vyučujúci. Cudzie telesá, napr. úlomky skla, sa z rany pri prvej pomoci nevyberajú.

Inhalácia škodlivých látok

Postihnutého je nutné premiestniť na čerstvý vzduch a uvoľniť odev. Ak postihnutý nedýcha, začne sa neodkladná resuscitácia. Ďalšie ošetrenie zabezpečí vyučujúci.

Požitie škodlivých látok

Je nutné okamžite informovať vyučujúceho, ktorý zaistí ošetrenie.

1. Základné zručnosti potrebné pre prácu v biochemickom laboratóriu

1.1 Váženie

Na navažovanie látok používame váhy. Váhy používané v chemickom laboratóriu sa dajú rozdeliť podľa niekoľkých hľadísk. Najbežnejšie je delenie podľa citlivosti, teda na koľko desatinných miest (v gramoch) sú schopné vážiť, a podľa svojej konštrukcie.

Delenie podľa citlivosti: váhy vážiace na celé gramy, na jedno alebo dve desatinné miesta sa nazývajú predvážky (1); váhy vážiace na tri desatinné miesta sú semianalytické váhy (2); na štyri desatinné miesta a viac sú váhy analytické (3).

Váživosť váh je údaj o maximálnej možnej hmotnosti, ktoré sú váhy schopné odvážiť.

Delenie podľa konštrukcie (má skôr okrajový význam): (1) váhy optomechanické, dnes už používané minimálne, nakoľko boli nahradené váhami elektronickými; (2) váhy elektronické, dnes najmodernejšie, predstavujú najčastejšie používaný druh váh.

Nech používame akýkoľvek typ váh, musíme dodržiavať niektoré základné pravidlá. **Vodováha** - váhy s presnosťou na jedno alebo dve desatinné miesta vyžadujú aspoň približne rovnú plochu. Pokiaľ nie je plocha dostatočne rovná na displeji váh sa objaví chybové hlásenie (Error xy). Pre váhy s väčšou presnosťou je vyžadovaná rovná plocha. Preto tento typ váh je od výroby vybavený vodováhou. Nastavenie vodorovnej polohy realizujeme aretačnými skrutkami váhy alebo váhy umiestnime na váhový stôl, ktorý vyvážíme. **Váhy musia byť vynulované** - po spustení váh musia ukazovať nulu. Pri mechanických a najmä optomechanických váhach býva zabudovaný nulovací mechanizmus, ktorým váhy vynulujeme. Častou príčinou zlého nulovania je nedodržanie podmienky vodováhy. Elektronické váhy sa väčšinou nulujú samé. **Váhy je nutné udržiavať v čistote.** Zabráni sa tým nielen ničeniu váh, ale aj možnej kontaminácii ďalšej navažovanej vzorky. Váhy sa utierajú suchou handričkou, ometajú štetcom, prípadne pri väčšom znečistení utierajú handričkou namočenou v alkohole.

Nikdy nevážime priamo na miske váh! Na navažovanie používame prednostne materiály, ktoré možno v prípade potreby opláchnuť (laboratórne sklo, porcelán, teflón prípadne kovové materiály určené na váženie). Filtračný papier je nevhodný pre svoju hrubosť a pórovitosť a zachytáva sa v ňom určité množstvo vzorky.

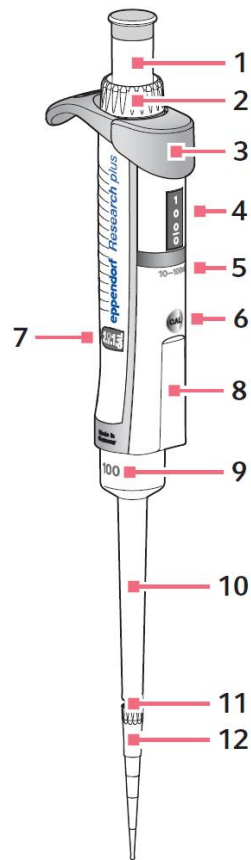
Tarovanie - väčšina elektronických a niektoré optomechanické váhy majú zabudovanú pomôcku na vynulovanie váh po vložení laboratórneho skla, na ktoré chceme navažovať. Nemusíme si tak zaznamenať hmotnosť tohto skla, ale po vložení skla necháme váhy ustáliť, a potom použijeme tarovanie. Váhy sa vynulujú a môžeme navažovať požadovanú hmotnosť.

1.2 Meranie objemu kvapalín - pipetovanie

V súčasnej dobe sa v biochemickom alebo molekulárno-biologickom laboratóriu pracuje takmer výhradne s automatickými jedno a viacnásobnými pipetami, ktoré nahradili menej presné sklenené pipety. Automatické pipety sú vhodné pre pipetovanie mikrolitrových objemov. Môžu byť s fixným alebo nastaviteľným objemom (1 - 10 ml, 1 - 5 ml, 100 - 1000 μ l, 20 - 200 μ l, 2 - 20 μ l alebo 0,2 - 2 μ l), pričom objem sa nastavuje otočením regulátora objemu a zobrazí sa na indikátore objemu. Typická automatická jednonásobná pipeta s nastaviteľným objemom je na Obr. 1.

Používajú sa dve techniky pipetovania – **pipetovanie smerom dopredu** a **reverzné pipetovanie**. **Pipetovanie smerom dopredu (priame pipetovanie)** je najčastejší spôsob pipetovania, pri ktorom dávkovací piest stlačíme do prvej polohy (po prvú zarážku) a pipetu s nasadenou špičkou kolmo ponoríme do kvapaliny (2-5 mm pod hladinu). Pomaly uvoľníme piest, pričom dochádza k nasatiu

kvapaliny do špičky. Pri vypúšťaní kvapaliny do reakčnej zmesi držíme špičku v miernom uhle proti stene nádoby a pomaly stlačíme piest po prvú zarážku. Po vytečení kvapaliny stlačíme piest do druhej polohy (po druhú zarážku), čím dosiahneme úplné vyprázdenie špičky (Obr. 2).



Obr. 1. Automatická pipeta s nastaviteľným objemom Eppendorf. 1. dávkovač, 2. regulátor objemu, 3. zhadzovač, 4. indikátor objemu, 5. jednokanálový vrchný diel s menovitým objemom, 6. justovací otvor, 7. indikátor justovania, 8. aktívne pole, 9. jednokanálový spodný diel s menovitým objemom, 10. zhadzovacie puzdro, 11. hrot kužeľa, 12. špička pipety.



Obr. 2. Pipetovanie smerom dopredu – priame pipetovanie.

Reverzný spôsob pipetovania sa využíva pri pipetovaní malých objemov do 50 μ l s cieľom minimalizovať relatívnu chybu pipetovania. Keďže pri reverznom pipetovaní sa nasáva väčší objem (ako je na pipete nastavený) možno s ním zlepšiť výsledky pipetovania aj pri práci s kvapalinami s vyššou

viskozitou a sklonom k peneniu. Pri nasávaní stláčame piest pipety až do druhej polohy (po druhú zarážku) a špičku kolmo vložíme do kvapaliny. Pomaly uvoľníme piest, pričom dochádza k nasatiu kvapaliny do špičky. Pri vypúšťaní kvapaliny do reakčnej zmesi držíme špičku v miernom uhle proti stene nádoby a pomaly stlačíme piest po prvú zarážku a počkáme, kým prestane kvapalina vytekať (Obr. 3). Zvyšná kvapalina zostáva v špičke – nepatrí k pipetovanej dávke!



Obr. 3. Reverzné pipetovanie.

V laboratórnej praxi sa môžeme stretnúť aj s **opakovaným pipetovaním**. Tento spôsob pipetovania je určený pre opakované pipetovanie rovnakého objemu, napr. na pridávanie činidla do série skúmaviek. Ide v podstate o opakujúce sa reverzné pipetovania. Po nasatí kvapaliny do špičky sa opakujú kroky 2 a 3 na Obr. 3.

Úloha 1. Pipetovanie destilovanej vody s kontrolou vážením

a) Pipetovanie väčších objemov použitím automatickej jednonálovej pipety s fixným objemom

Pomôcky: kadička, automatické jednonálové pipety, špičky (modré a biele), analytické váhy

Pracovný postup: Na miskú váh položte prázdnu malú kadičku (20 alebo 50 ml), do ktorej budete pipetovať destilovanú vodu, a stlačte tlačidlo pre tarovanie (vynulovanie hmotnosti na váhach položennej nádoby, v ktorej vážime). Kadičku preneste z miskú váh na pracovný stôl a postupne do nej napipetujte destilovanú vodu v nasledujúcich objemoch:

3 x 3000 μ l; 2 x 1000 μ l; 1 x 500 μ l

Pre pipetovanie 3000 μ l (3 ml) použijete automatickú pipetu s fixným (prípadne nastaviteľným) objemom a príslušnú veľkú bielu špičku. Vždy je potrebné prekontrolovať, že spojenie špičky s pipetou je pevné. Automatické pipety, ktoré budete používať, sa nasadzovaním a zložením špičky ľahko v mieste pripojenia špičky povolia, potom dostatočne netesnia a pipetovaná kvapalina zo špičky vyteká! Podobne budete automatickou pipetou s fixným objemom pipetovať 1000 μ l (1 ml) a 500 μ l (0,5 ml), pričom použijete modrú špičku. Použite priamy spôsob pipetovania.

Po dokončení pipetovania kadičku položte na miskú váh a odčítajte hmotnosť napipetovanej destilovanej vody. Porovnajte skutočný odvážený výsledok s očakávanou hodnotou vypočítanou súčtom pipetovaných objemov a prepočtom objemu na hmotnosť použitím hustoty. Uvažujte hustotu destilovanej vody pri teplote v laboratóriu rovnú $\rho = 1,000 \text{ g/cm}^3$.

Očakávaný objem	Očakávaná hmotnosť	Skutočná hmotnosť

b) Pipetovanie menších objemov použitím nastaviteľnej automatickej pipety

Pomôcky: skúmavky typu Eppendorf (eppendorfy), automatické nastaviteľné pipety, špičky (modré a žlté), analytické váhy

Pracovný postup: Na miskú váh položte prázdnu plastovú skúmavku - eppendorfku, do ktorej budete pipetovať destilovanú vodu a stlačte tlačidlo pre tarovanie. Vezmite otvorenú eppendorfku do ruky a postupne do nej napipetujte destilovanú vodu s nasledovným objemom:

265 μ l; 35 μ l

Na pipetovanie objemu 265 μ l použite automatickú pipetu s rozsahom 100 – 1000 μ l a modrú špičku. Na pipetovanie objemu 35 μ l použite automatickú pipetu s rozsahom 20 – 200 μ l a žltú špičku. Použite priamy a reverzný spôsob pipetovania.

Po dokončení pipetovania eppendorfku uzavrite, položte na miskú váh a odčítajte hmotnosť napipetovanej destilovanej vody. Porovnajte skutočný odvážený výsledok s očakávanou hodnotou vypočítanou súčtom pipetovaných objemov a prepočtom objemu na hmotnosť použitím hustoty. Uvažujte hustotu destilovanej vody pri teplote v laboratóriu rovnú $\rho = 1,000 \text{ g/cm}^3$.

Očakávaný objem	Očakávaná hmotnosť	Skutočná hmotnosť

c) Zistenie hustoty roztoku

Pomôcky: eppendorfy, automatická pipeta, modré špičky, analytické váhy

Pracovný postup: Na miskú váh položte prázdnu eppendorfku a stlačte tlačidlo pre tarovanie. Do eppendorfky pipetujte presne 1000 μ l roztoku, ktorého hustotu máte zistiť. Pre pipetovanie 1000 μ l použite pipetu s nastaviteľným objemom v rozsahu 100-1000 μ l a modrú špičku. Eppendorfku uzavrite, položte na miskú váh a odčítajte hmotnosť napipetovaného roztoku.

Zo známeho objemu a hmotnosti vypočítajte hustotu.

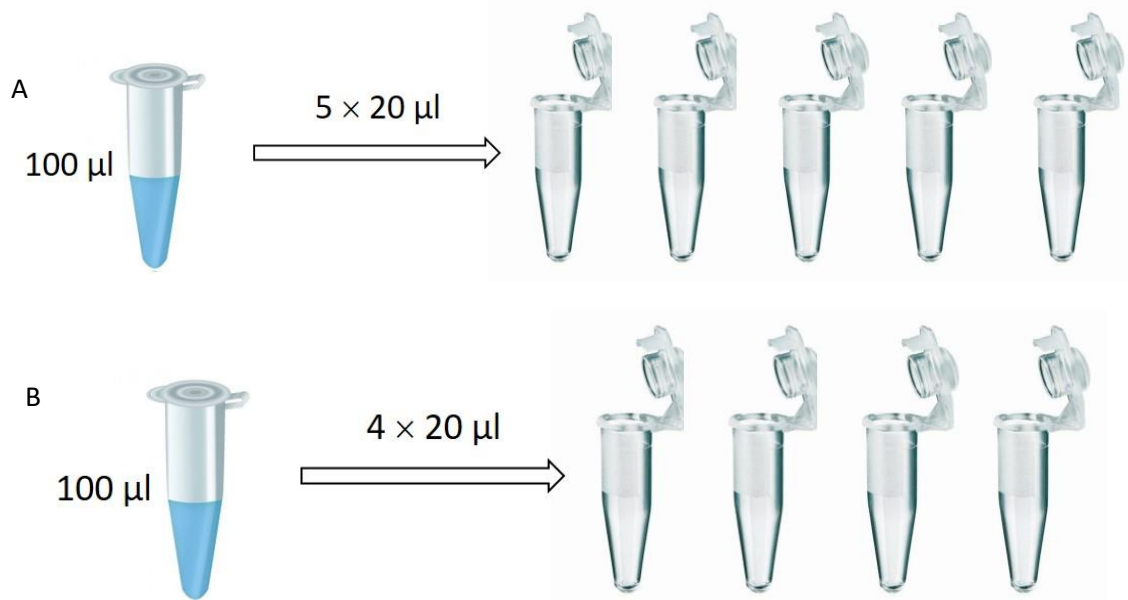
Objem	Hmotnosť	Hustota

d) Príprava roztoku a jeho presné rozpipetovanie

Pomôcky: eppendorfky, automatické pipety s nastaviteľným objemom, žlté a biele špičky

Pracovný postup: Do eppendorfky napipetujte 85 μl destilovanej vody a 15 μl farebného roztoku (napr. roztok metylénovej modrej). Na pipetovanie 85 μl použite pipetu s nastaviteľným objemom v rozsahu 20-200 μl a žltú špičku. Na pipetovanie 15 μl použite pipetu s nastaviteľným objemom v rozsahu 2-20 μl a malú bielu špičku. Pridávate veľmi malý objem, preto je ústie špičky potrebné ponoriť pod hladinu roztoku, ktorý už je v eppendorfke. Počas pridávania na 15 μl výsledný roztok aj premiešajte. Na tento účel najlepšie posluží opakované nasávanie a vypúšťanie do špičky pipety, teda pohyb roztoku v špičke hore a nadol. V našom prípade je roztok farebný, mali by ste priamo vidieť, či už je dostatočne premiešaný. Dajte pozor, aby špička po jej vytiahnutí spod hladiny na konci premiešania bola prázdna!

Do stojanu si pripravte 5 mikroskúmaviiek (eppendorfiek) a do každej pipetujte presne 20 μl pripraveného roztoku (Obr. 4). Použite priamy i reverzný spôsob pipetovania.



Obr. 4. Spôsob rozpipetovania pripraveného roztoku. A – použite priame pipetovanie, B – použite reverznú pipetovanie.

Vyhodnoťte ako presne a správne ste v oboch prípadoch pipetovali:

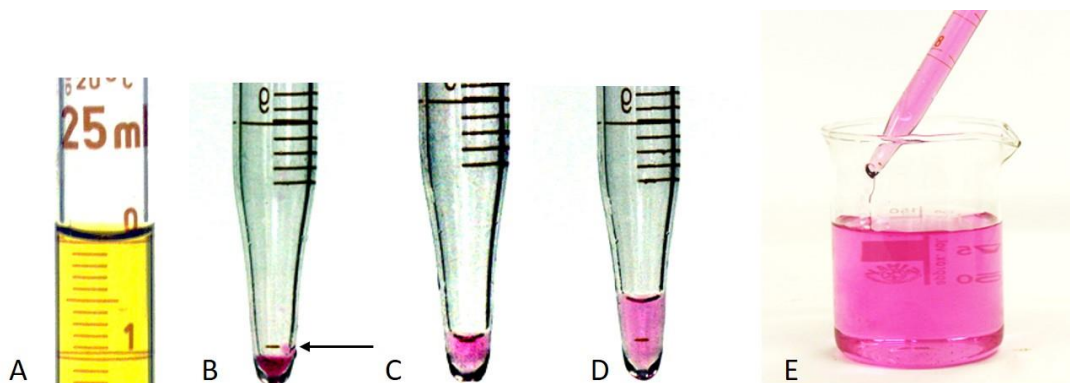
e) Pipetovanie veľkých objemov

Pomôcky: titračná banka, sklenená pipeta, pipetovací nástavec alebo balónik, dávkovacia fľaša s 0,1 M HCl, metylová červeň

Pracovný postup: Do titračnej banky pipetujte 10,0 ml destilovanej vody a pridajte: 5,0 ml 0,1 M HCl a 5 kvapiek indikátora (metylová červeň). Na pipetovanie 10,0 ml destilovanej vody

použite sklenenú pipetu s pipetovacím nastavcom alebo balónikom. 5,0 ml 0,1 M HCl pridajte z dávkovacej fľaše (je určená na dávkovanie agresívnych reagensů a ide o nádobu s piestom, na ktorom je možné nastaviť požadovaný objem). Pri dávkovaní sa celý piest vytiahne na doraz hore a potom sa pomaly stlačí späť dole. V poslednom kroku pridáte 5 kvapiek indikátora.

Uvedený roztok použite na nácvik pipetovania (Obr. 5). V prípade pipetovania celého objemu, je nutné vypustiť kvapalinu až po označenú rysku.



Obr. 5. Technika pipetovania. A – správne odčítanie objemu na spodný meniskus odmeriavanej kvapaliny, B – napipetovaný väčší objem, C – napipetovaný správny objem, D – nie je napipetovaný celý objem, E – priložením pipety k stene nádoby dosiahneme vypustenie pipety až po koncovú rysku.

1.3 Spektrofotometria

Pri stanovení mnohých biochemicky významných látok (sacharidov, proteínov, nukleových kyselín) sa využívajú optické metódy, nakoľko sú rýchle, citlivé, presné a navyše nedeštruktívne, čo znamená, že po meraní môžeme roztok ďalej používať a spracovávať inými metódami. Optické metódy sú založené na interakcii elektromagnetického žiarenia s hmotou.

Spektroskopia je fyzikálno-chemická disciplína zaoberajúca sa vznikom a vlastnosťami všetkých druhov spektier, interakciami medzi hmotou a elektromagnetickým žiarením. Skúma závislosť absorpcie, emisie alebo rozptylu elektromagnetického žiarenia ako funkcie vlnovej dĺžky (λ) alebo frekvencie (f). Interpretáciou výsledkov môžeme získať informácie o kvantite a kvalite skúmaných látok. K spektroskopii zaraďujeme aj **absorpčnú spektrofotometriu**, ktorá sa zaoberá meraním a interpretáciou elektrónových spektier molekúl látok, ktoré absorbujú elektromagnetické žiarenie v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm.

Absorpcia žiarenia je charakteristickou optickou vlastnosťou látok. Pri interakcii elektromagnetického žiarenia (svetla) vhodnej vlnovej dĺžky s časticami látky (atómami a molekulami) dochádza k využitiu energie fotónu (absorpcii) na excitáciu valenčných elektrónov. Intenzita vystupujúceho svetla (I) je teda menšia ako intenzita svetla, ktoré na látku dopadá (I_0) a platí pre ňu Lambertov zákon:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\mu \cdot l}$$

kde l je hrúbka absorbujúcej vrstvy a veličina μ predstavuje lineárny absorpčný koeficient. Pomer intenzity vystupujúceho a dopadajúceho svetla nazývame transmitancia (T):

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

Hodnoty T sa pohybujú od 0 (pohlť sa všetko žiarenie) až po 1 (všetko žiarenie prechádza) a niekedy sa udáva aj v percentách. Záporný dekadický logaritmus transmitancie sa nazýva absorbanca (A):

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \mu \cdot l$$

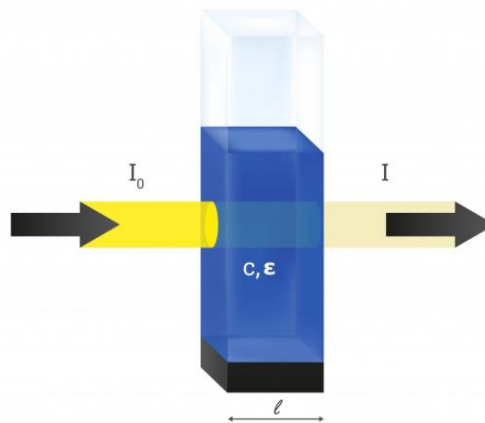
Spektrum, ktoré vzniká prechodom svetla určitou látkou, označujeme ako **absorpčné spektrum** a predstavuje grafickú závislosť absorbancie od vlnovej dĺžky.

Pre absorpciu v roztokoch platí Beerov zákon, kde absorpčný koeficient roztoku je priamo úmerný koncentrácii c :

$$\mu = \varepsilon \cdot c$$

Koncentráciu c zvyčajne uvádzame ako molárnu, preto veličinu ε (konštanta úmernosti) nazývame molárny absorpčný koeficient. ε je špecifický pre danú látku a vlnovú dĺžku. Kombinácia vyššie uvedených vzťahov je známa ako Lambertov-Beerov zákon (Obr. 6):

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



Obr. 6. Grafické znázornenie Lambert-Beerovho zákona.

Absorbanca je veľmi užitočná veličina priamo úmerná koncentrácii látky c a hrúbke absorbujúcej vrstvy l , čo v našom prípade predstavuje dĺžku optickej dráhy (šírky) kvety (najčastejšie 1 cm). Platnosť Lambert-Beerovho zákona je obmedzená iba na monochromatické svetlo, konštantnú dĺžku kvety a rovnaké rozpúšťadlo.

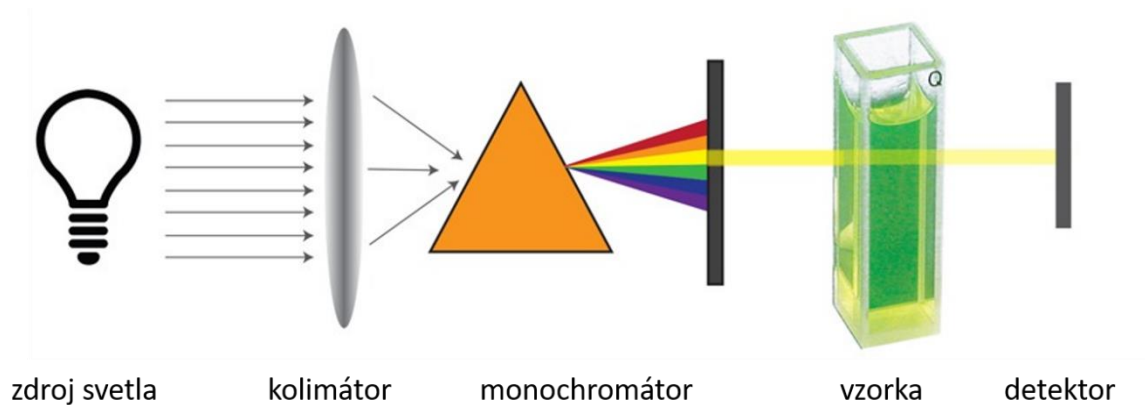
Skúmaním spektroskopických vlastností vo viditeľnej (VIS) a ultrafialovej (UV) oblasti spektra sa zaoberá **UV/VIS spektroskopia** a **fotometria**. Využíva svetlo z UV oblasti (vlnová dĺžka 10 – 390 nm), viditeľnej oblasti (vlnová dĺžka 390 – 790 nm) a príležitostne infračervenej oblasti (vlnová dĺžka 770 nm – 1000 nm). Spektrofotometria v najjednoduchšom usporiadaní pre viditeľnú oblasť sa nazýva kolorimetria. Látky, ktoré absorbujú len žiarenie s vlnovou dĺžkou menšou než 380 nm (ultrafialové žiarenie), sa prejavujú ako bezfarebné. Naopak látky, ktoré absorbujú z bieleho slnečného žiarenia vlnové dĺžky v rozsahu 380 až 770 nm, sa prejavujú ako farebné.

UV/VIS spektrofotometria nám teda vďaka platnosti Lambert-Beerovho zákona umožňuje zistiť neznámu koncentráciu neznámych roztokov látok (v našom prípade potravinárskych farbív). Tá sa určuje dvoma spôsobmi: metódou kalibračnej krivky (pozri Úloha 3) a metódou štandardného prídatku.

Metóda kalibračnej krivky je postup, kedy sa zmeria absorbancia niekoľkých kalibračných roztokov s rôznou koncentráciou, a to v rovnakej kyvete a pri rovnakej vlnovej dĺžke. Z kalibračnej krivky môžeme následne overiť platnosť Lambert-Beerovho zákona. Výsledná závislosť by v ideálnom prípade mala byť lineárna, prechádzajúca začiatkom - tzv. kalibračná priamka. Táto metóda je však použiteľná len pre jednoduchú maticu.

Metóda štandardného prídavku je postup, počas ktorého sa zmeria absorbancia neznámej vzorky a potom sa koncentrácia látky vo vzorke zvýši definovaným prídavkom štandardu, a meria sa zodpovedajúca absorbancia roztoku. Touto metódou sa dá stanoviť látka v zložitej matici, kedy by stanovenie metódou kalibračnej krivky bolo pomerne zložité.

Na **určenie absorbancie** farebných roztokov najčastejšie využívame spektrofotometer (Obr. 7, 8), do ktorého vložíme kyvetu s farebným roztokom. Spektrofotometer meria intenzitu svetla po prechode vzorkou (I) a dáva ju do pomeru k intenzite svetla pred prechodom vzorkou (I_0). Navyše, spektrofotometer umožňuje nastavenie ľubovoľnej vlnovej dĺžky monochromatického svetla alebo tiež meranie absorbancie spektra v určitom úseku vlnových dĺžok. Na základe vyššie uvedených vzťahov medzi veličinami môžeme určovať transmitanciu, absorbanciu alebo koncentráciu látky v roztoku.



Obr. 7. Schéma spektrofotometra.



Obr. 8. Spektrofotometer Specord 50 použitý v experimentálnej časti.

Stanovenie koncentrácie neznámej látky pomocou rovnice lineárnej regresie. Rovnicou lineárnej regresie:

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

vyjadríme teoretickú závislosť nameranej absorpcie vzorky od koncentrácie. Vzorec všeobecnej rovnice lineárnej regresie vychádza z Lambert-Beerovho zákona. Obsahuje dve premenné (x , y) a dva regresné koeficienty (a , b). Obe premenné môžeme ľahko nahradiť veličinami z grafu kalibračnej krivky, ktorá nám vyjadruje závislosť absorpcie od koncentrácie. Teda x znamená koncentráciu (c) a y absorpciu (A). Rovnica by teda po úprave mala tvar:

$$A = a + b \cdot c$$

Regresný koeficient a vyjadruje možnú systematickú chybu merania (prípadne odchýlky spôsobené nečistotami na stene kyvety a pod.). Tým, že predpokladáme jeho existenciu, tieto chyby "odfiltruje". Lineárny člen $b \cdot c$ už zodpovedá "čistému" Lambert-Beerovmu zákonu. Podľa neho je absorpcia roztoku rovná:

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

Koncentrácia vystupuje v oboch výrazoch, preto môžeme povedať, že koeficient regresie b sa rovná súčinu molárneho koeficientu extinkcie a šírky kyvety:

$$b = \varepsilon \cdot l$$

Tento prvok nám v rovnici regresie vyjadruje smernicu priamky. Odtiaľ určíme molárny extinkčný koeficient:

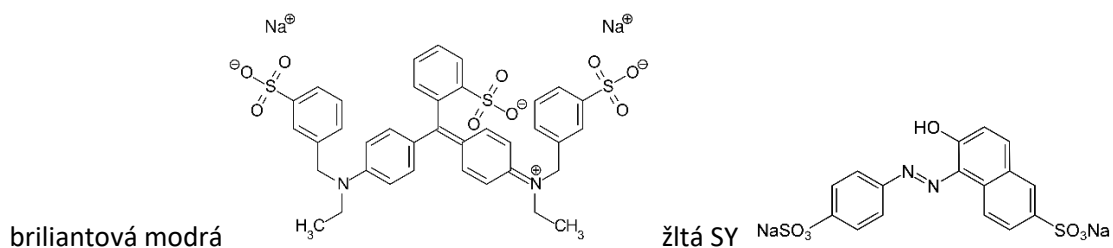
$$\varepsilon = b/l$$

Musíme však dať pozor na jednotky, nakoľko koncentrácia sa uvádza v $\mu\text{mol/l}$, zatiaľ čo šírka kyvety je v centimetroch. Ak poznáme regresné koeficienty, môžeme neznámu koncentráciu roztoku určiť zo zmeranej absorpcie podľa vzťahu:

$$c = \frac{A - a}{b}$$

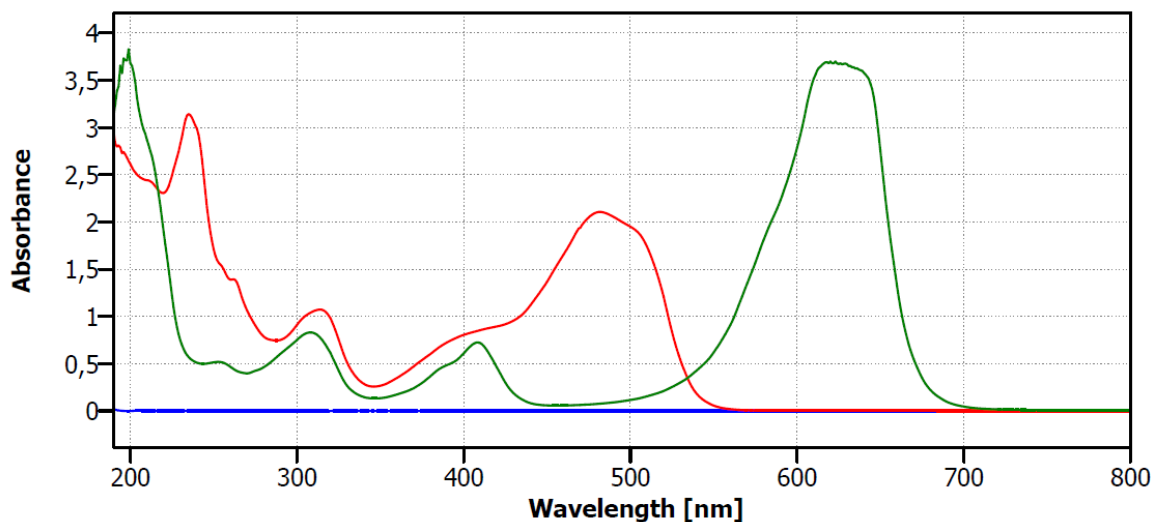
Úloha 2. Meranie absorpčného spektra potravinárskych farbív

SPECORD 50 plus je spektrofotometer, ktorý meria v oblasti vlnových dĺžok 190 – 1100 nm. Umožňuje meranie absorpcie v intervale hodnôt $A = (-3) - (+3)$. Spektrofotometer ovládame pomocou programu WinASPECT, ktorý súčasne umožňuje jednoduchú a rýchlu analýzu dát. Farbivo FCF brilantová modrá absorbuje vo fialovej a červenej oblasti spektra viditeľného žiarenia, žltá SY absorbuje v modrej oblasti spektra viditeľného žiarenia (Obr. 9).



Pomôcky: automatické pipety, pipetovacie špičky, kadičky, odmerné banky, kyvety, spektrofotometer Specord 50 plus

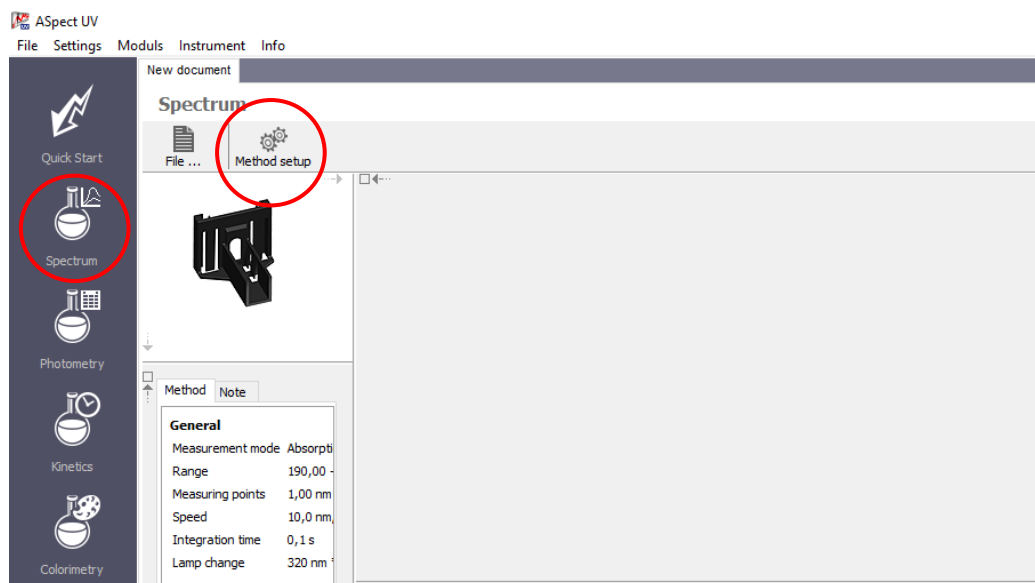
Chemikálie: zásobný roztok potravinárskeho farbiva FCF brilantová modrá (40 mg/L), zásobný roztok potravinárskeho farbiva žltá SY (40 mg/L), destilovaná alebo deionizovaná voda



Obr. 9. UV-Vis spektrum FCF briliantovej modrej (zelená čiara) a žltej SY (červená čiara).

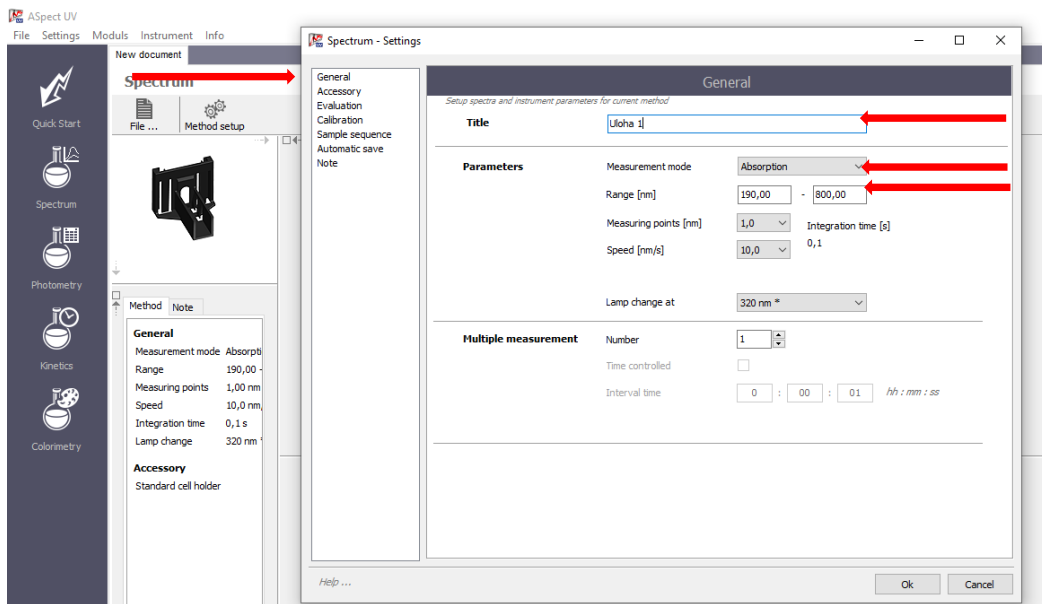
Pracovný postup:

1. Do označených kadičiek nalejte destilovanú vodu, pripravené roztoky potravinárskych farbív.
2. Zapnite spektrofotometer a PC.
3. Spustíte program WinAspect z ikony na pracovnej ploche.
4. Po spustení programu zvolíte z ľavého menu panel „Spectrum“ (Obr. 10).
5. Po otvorení ponuky vyberte „Method setup“ pre nastavenie parametrov merania (Obr. 10).



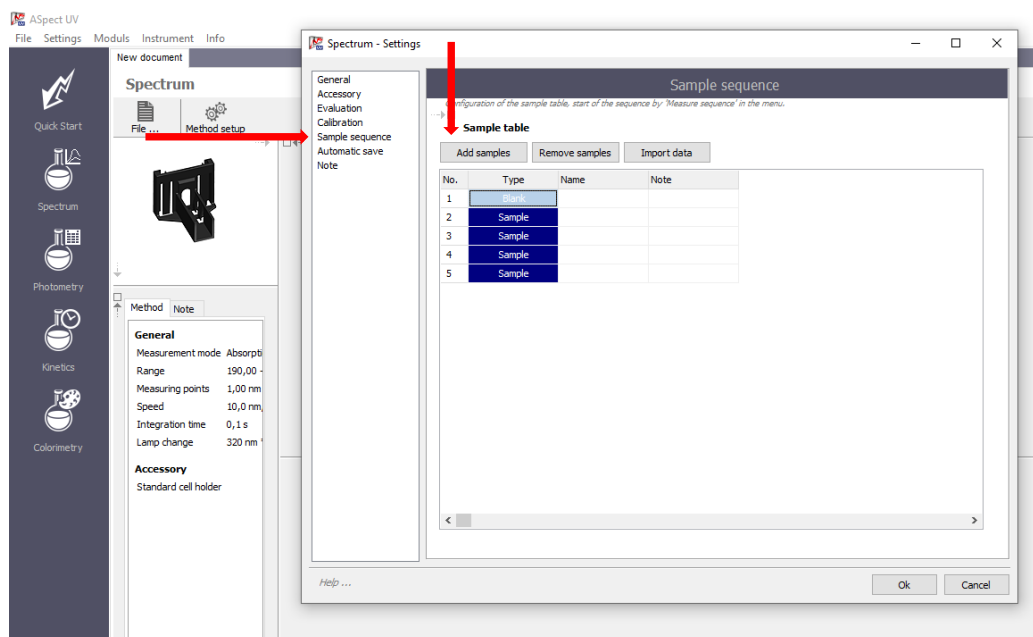
Obr. 10. Nastavenie spektrofotometra.

6. V paneli „General“ zvolíte názov (Title) dokumentu a nastavíte nasledovné parametre: Measurement mode – Absorption; Range – 190 – 800 nm. Ostatné parametre ostávajú nezmenené (Obr. 11).



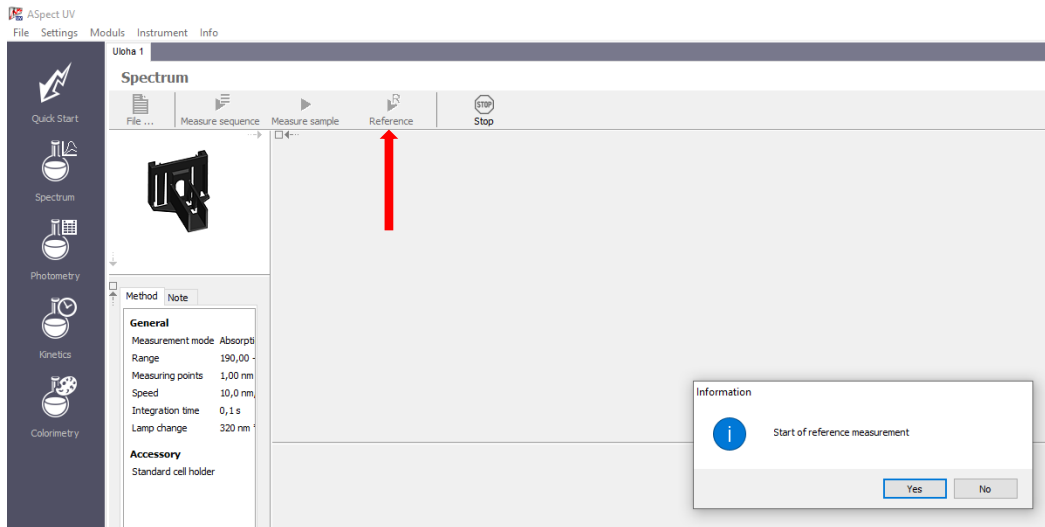
Obr. 11. Nastavenie spektrofotometra - metóda.

7. V paneli „Sample sequence“ zvolte počet vzoriek kliknutím na „Add samples“. Pridajte odpovedajúci počet vzoriek (Sample) a slepú vzorku (Blank). V prípade vzoriek zvolte poradie merania „At the end“, pri slepej vzorke „At start“ (Obr. 12) a stlačte „OK“.



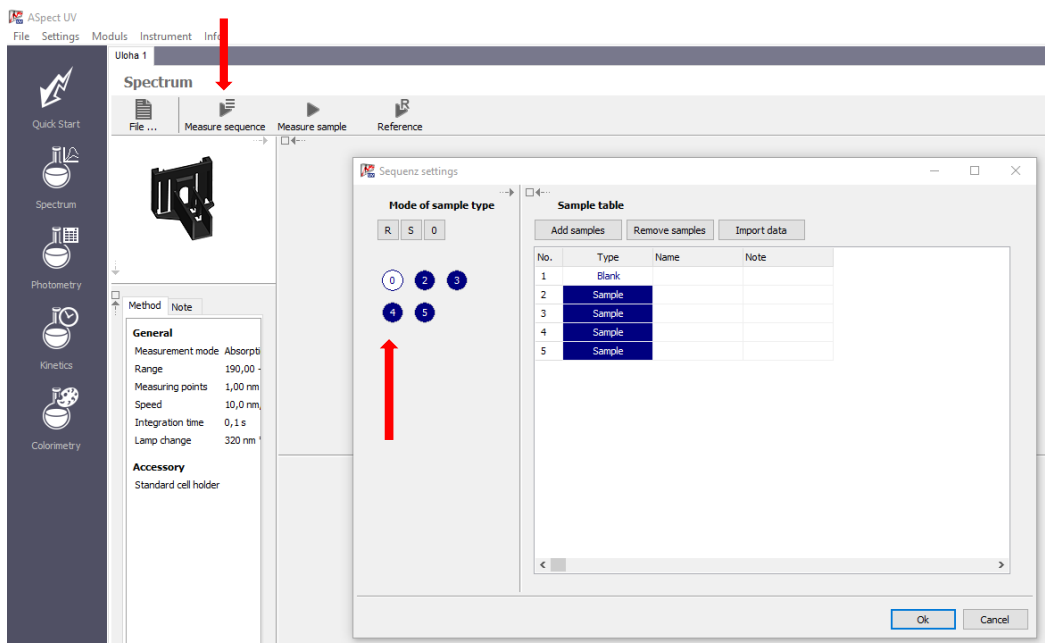
Obr. 12. Nastavenie spektrofotometra - vzorky.

8. Pred samotným meraním je nutné uskutočniť referenčné meranie. Farbivá sú rozpustené v destilovanej vode, preto použijeme ako blank destilovanú vodu. Zvolte ikonu „Reference R“, otvorte kryt spektrofotometra a kolmo vložte do držiaka kyvetu s destilovanou vodou. Kyvetu vždy držte za matnú stranu. Svetelný lúč prechádza čírymi stranami a ich znečistením (napr. odtlačkom prstu) môže dôjsť ku skresleniu výsledkov merania. Spustite referenčné meranie (Obr. 13). Po skončení merania stlačte „OK“.



Obr. 13. Nastavenie spektrofotometra – referenčné meranie.

9. V tejto chvíli je spektrofotometer pripravený na meranie. Zvolením možnosti „Measure sequence“ sa otvorí okno, ktoré nás informuje o nastavenom poradí vzoriek (Obr. 14). Po stlačení „OK“ začneme s meraním spektra slepej vzorky. Podľa postupu vyššie vložíme kolmo do držiaka kyvetu s destilovanou vodou. Po potvrdení vloženia spektrofotometer zmeria absorpčné spektrum vody. Rovnako budeme postupovať aj v prípade vzoriek roztokov potravinárskych farbív. Dbajte na to, aby bola kyveta vždy čistá a medzi meraniami kyvetu vždy premyte destilovanou vodou. **Spektrofotometer je prístroj citlivý na vyliatie kvapalín. Pracujte preto opatrne a v prípade rozliatia kvapaliny miesto ihneď osušte (napr. buničitou vatou).**



Obr. 14. Nastavenie spektrofotometra – meranie vzoriek.

10. Po skončení merania prevedieme výsledky do podoby dokumentu a uložíme pod svojím menom.
 11. Vyhodnotenie výsledkov.

Úloha 3. Stanovenie koncentrácie neznámej vzorky a Lambert-Beerov zákon

Podľa Lambert-Beerovho zákona je závislosť absorpcie od koncentrácie v určitom koncentračnom rozsahu lineárna. Preto je potrebné pred meraním neznámych vzoriek určiť koeficient úmernosti a zostrojiť kalibračnú krivku pomocou merania absorpcie vzoriek so známou koncentráciou.

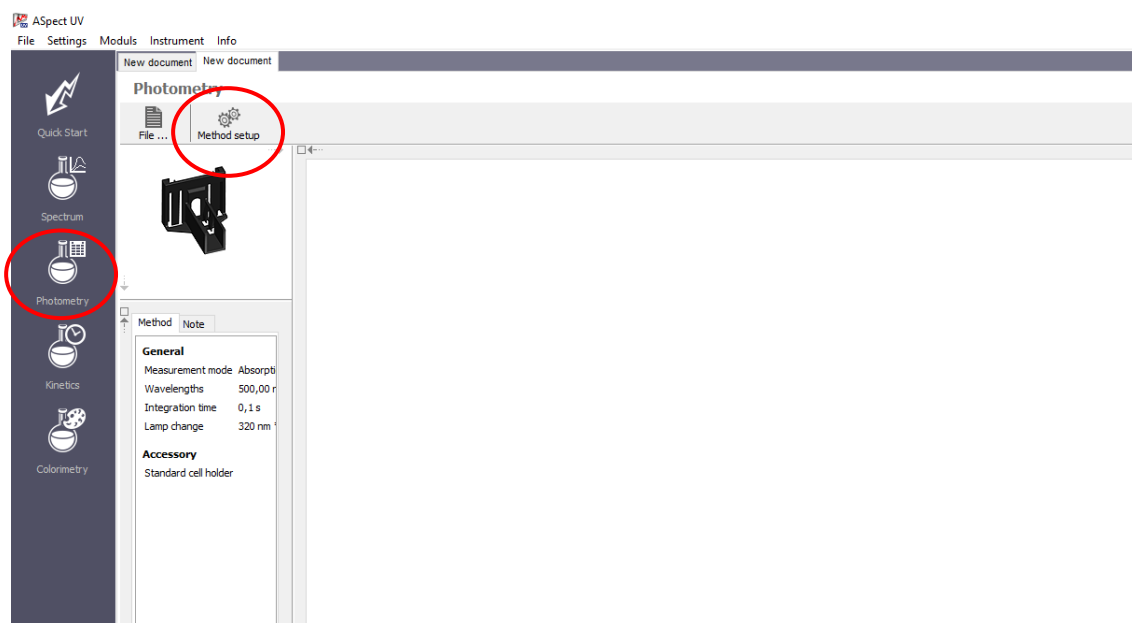
Pomôcky: automatické pipety, pipetovacie špičky, kadičky, odmerné banky, kyvety, spektrofotometer Specord 50 plus

Chemikálie: zásobný roztok potravinárskeho farbiva FCF briliantová modrá (40 mg/L), zásobný roztok potravinárskeho farbiva žltá SY (40 mg/L), roztoky farbív s neznámou koncentráciou, destilovaná alebo deionizovaná voda

Pracovný postup: Pripravte si 50 ml zásobného roztoku potravinárskych farbív FCF briliantová modrá a žltá SY s koncentráciou 40 mg/l. Tieto následne nariedzte destilovanou vodou tak, aby ste pripravili roztoky s koncentráciou 20, 10, 5 a 2,5 mg/l. Po príprave vzoriek zmerajte ich absorpciu pri vlnovej dĺžke, ktorú určíte podľa spektier farbív FCF briliantová modrá a žltá SY nameraných v úlohe 2.

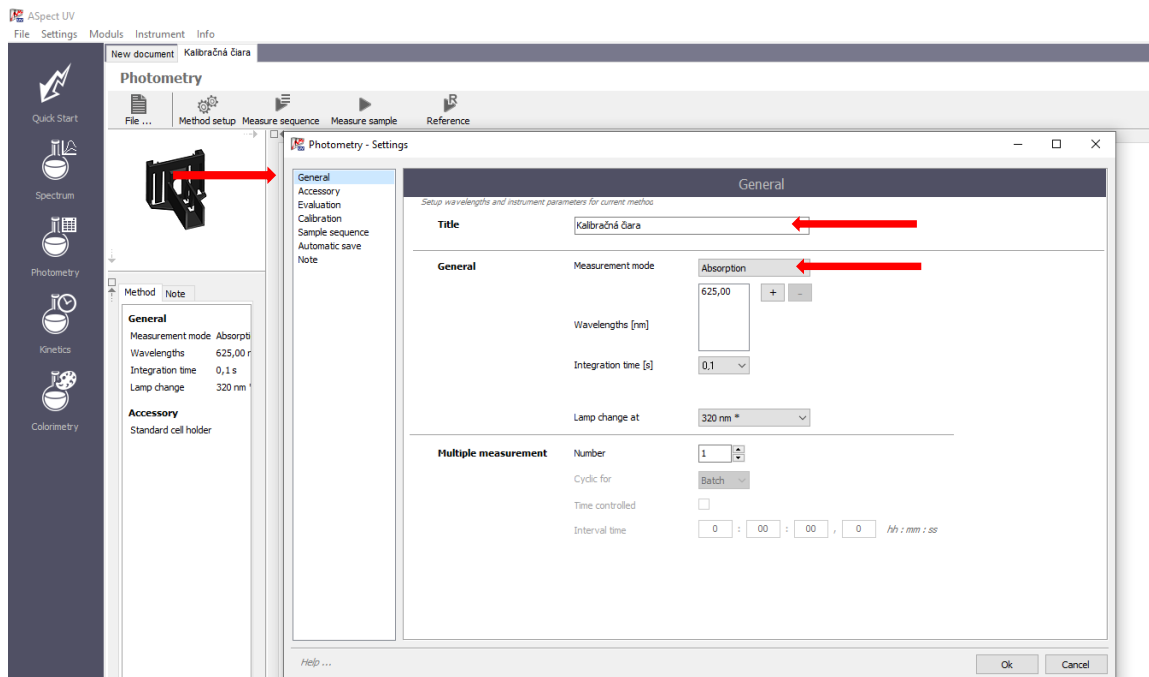
Najprv si zostrojíte kalibračnú čiaru, ktorá zobrazuje závislosť spektrofotometrom nameranej absorpcie od koncentrácie roztoku. Program WinAspect na základe kalibračnej krivky vypočíta hodnoty potrebné pre výpočet molárneho koeficientu extinkcie a nakoniec určí neznámu koncentráciu vzorky v kyvete.

1. Do označených kadičiek nalejte destilovanú vodu, pripravené roztoky potravinárskych farbív s požadovanou koncentráciou.
2. Zapnite spektrofotometer a PC.
3. Spustíte program WinAspect z ikony na pracovnej ploche.
4. Po spustení programu zvolíte z ľavého menu panel „Photometry“ (Obr. 15).
5. Po otvorení ponuky vyberte „Method setup“ pre nastavenie parametrov merania (Obr. 15).



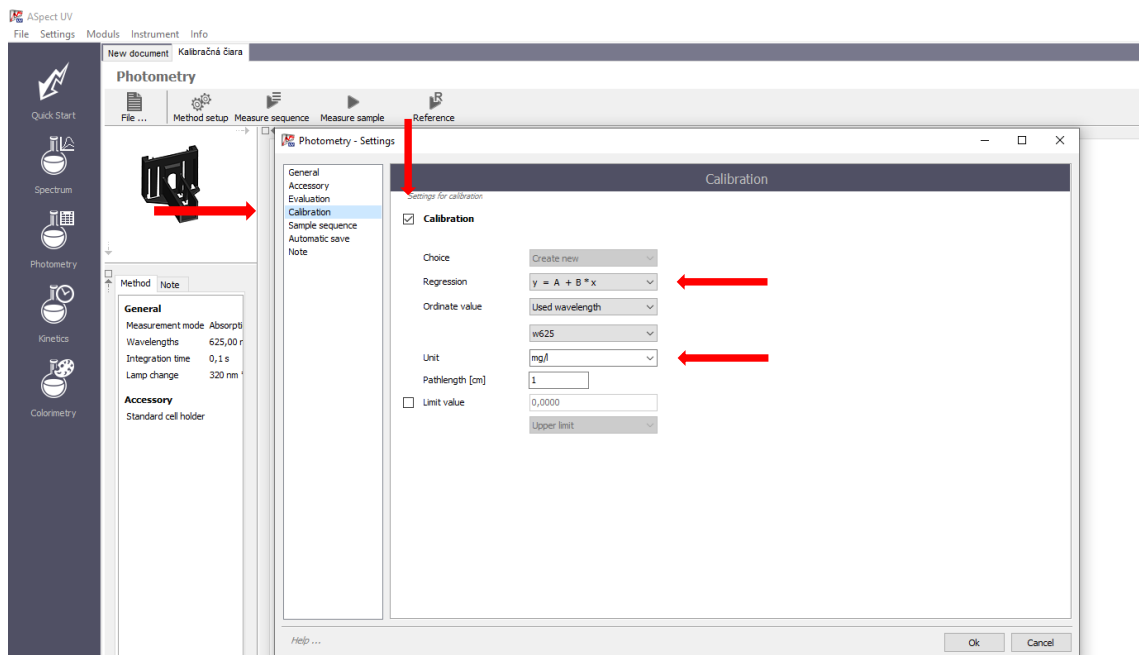
Obr. 15. Základné nastavenie spektrofotometra.

6. V paneli „General“ zvolte názov (Title) dokumentu a nastavte nasledovné parametre: Measurement mode – Absorption; Wavelength (nm) – 625 (pre FCF briliantovú modrú). Ostatné parametre ostávajú nezmenené (Obr. 16).



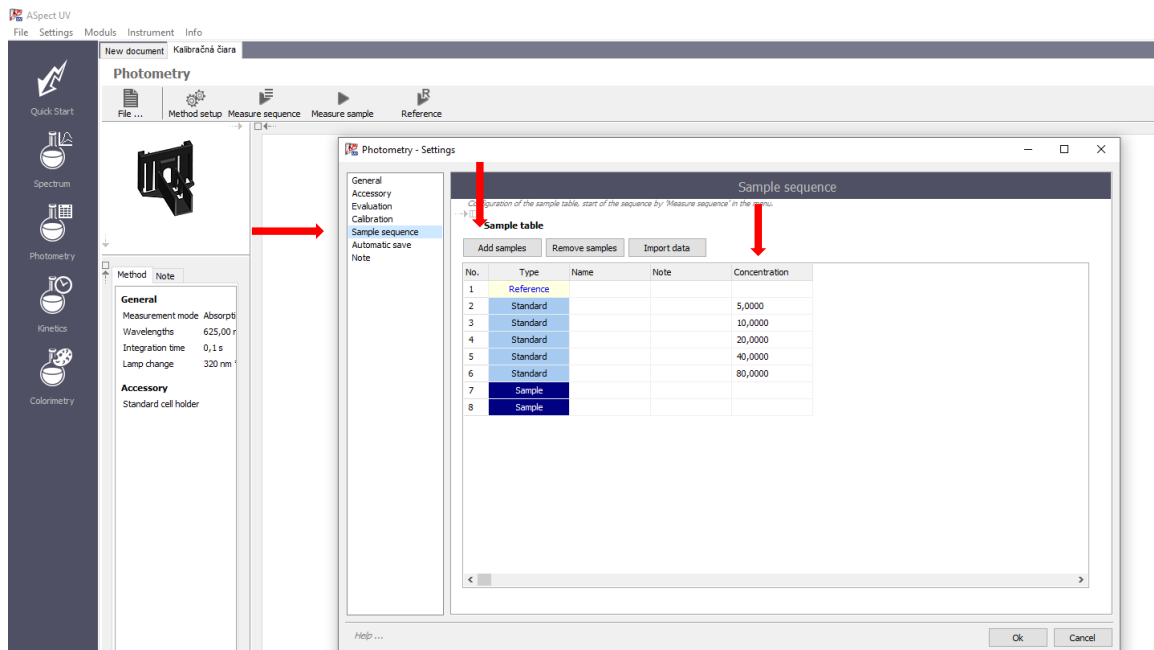
Obr. 16. Nastavenie spektrofotometra - metóda.

7. Zvolte panel „Calibration“ a potvrdte výber (Obr. 17). Vyberte rovnicu pre lineárnu regresiu a zvolte jednotku „Unit“, v tomto prípade mg/l. Ostatné parametre ostávajú nezmenené.



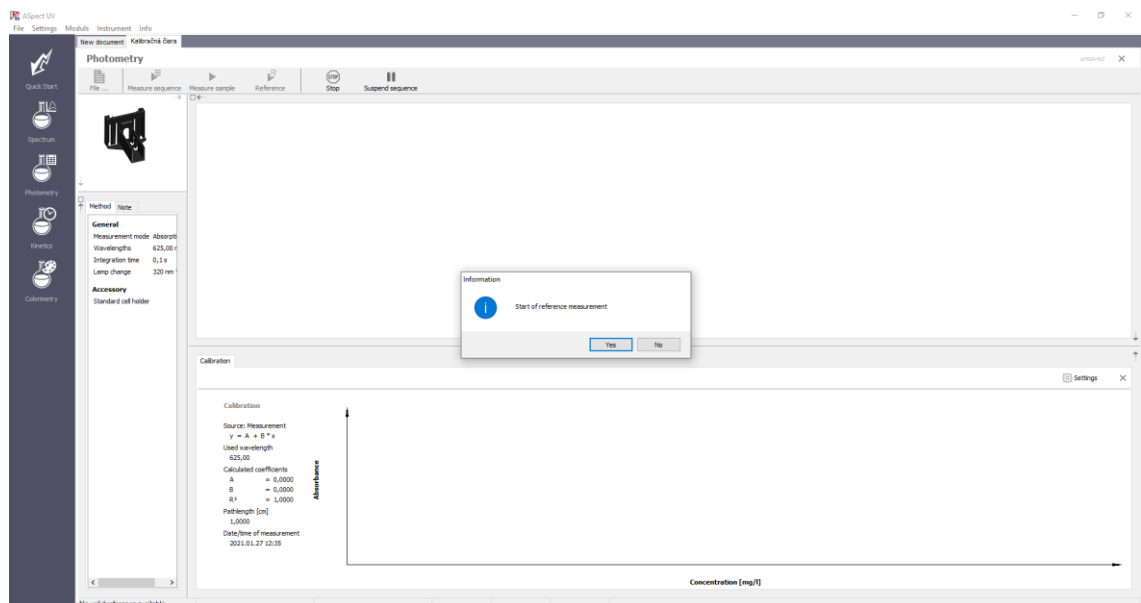
Obr. 17. Nastavenie spektrofotometra - kalibrácia.

8. V paneli „Sample sequence“ zvolte počet vzoriek kliknutím na „Add samples“. Pridajte odpovedajúci počet štandardov (Standard) s uvedením ich koncentrácie, pridajte počet vzoriek (Sample) a referenčnú vzorku (Reference). Poradie merania nastavíte pomocou voľby „At the end“ a „At start“ (Obr. 18). Stlačte „OK“.



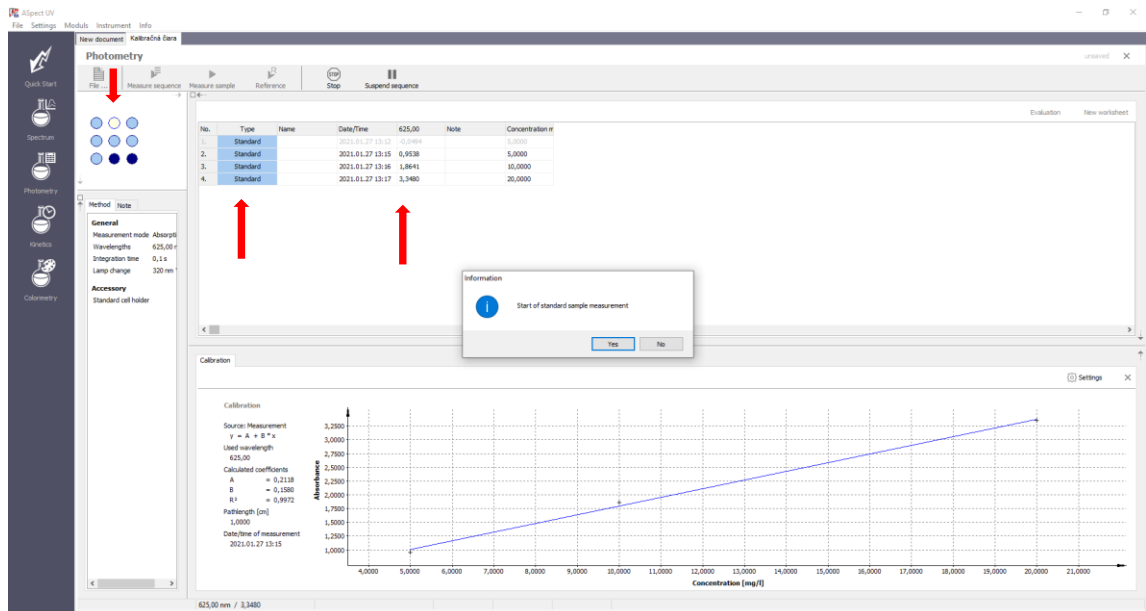
Obr. 18. Nastavenie spektrofotometra – štandardy a vzorky.

9. Z ponuky zvolte „Measure sequence“. Zobrazí sa výzva na uskutočnenie referenčného merania (Obr. 19). Nakoľko sú farbivá rozpustené v destilovanej vode, použijeme ako blank destilovanú vodu. Otvorte kryt spektrofotometra a kolmo vložte do držiaka kvetu s destilovanou vodou. Kvetu vždy držte za matnú stranu. Svetelný lúč prechádza čírymi stranami a ich znečistením môže dôjsť ku skresleniu výsledkov merania. Spustite referenčné meranie stlačením „Yes“.



Obr. 19. Referenčné meranie.

10. Spektrofotometer je pripravený na meranie. Informuje nás o poradí štandardov a vzoriek (Obr. 20), ktoré postupne vkladáme do spektrofotometra a meriame absorbanciu. Dbajte na to, aby bola kvveta vždy čistá a medzi meraniami kvvetu vždy premyte destilovanou vodou. **Spektrofotometer je prístroj citlivý na vyliatie kvapalín. Pracujte preto opatrne a v prípade rozliatia kvapaliny miesto ihneď osušte (napr. buničitou vatou).**



Obr. 20. Meranie štandardov a vzoriek.

11. Po zmeraní štandardov je kalibračná čiara aj s rovnicou regresie zobrazená v okne „Calibration“. Pri neznámych vzorkách spektrofotometer zmeria absorbanciu a na základe určených regresných koeficientov vypočíta koncentráciu farbiva v roztoku.

12. Kalibračnú čiaru spolu s výsledkami merania neznámych vzoriek uložte v PC pod svojím menom.

13. Vyhodnoťte výsledky merania.

1.4 Centrifugácia

Centrifugácia (odstreďovanie) patrí k najbežnejším operáciám v biochemickom laboratóriu. Dovoľuje oddeliť zložky suspenzie alebo emulzie na základe rozdielnych hustôt. Často je rýchlejšia a najmä pohodlnejšia ako filtrácia a v niektorých prípadoch vedie aj k lepšiemu oddeleniu pevnej a kvapalnej fázy. Okrem nahradenia alebo doplnenia filtrácie, najmä ak je suspendovaná látka veľmi jemná, zle filtrovateľná, a teda filtrácia je zdĺhavá, má odstreďovanie v biochémií aj iný význam. Slúži na niektoré špeciálne preparatívne a analytické účely (napr. izolácia mitochondrií diferenčnou centrifugáciou). Centrifugácia môže byť použitá na prípravu bunkových štruktúr gradientovým odstreďovaním. Z analytických aplikácií je zaujímavé stanovenie relatívnych molekulových hmotností zlúčenín a stanovenie čistoty izolovaných prípravkov.

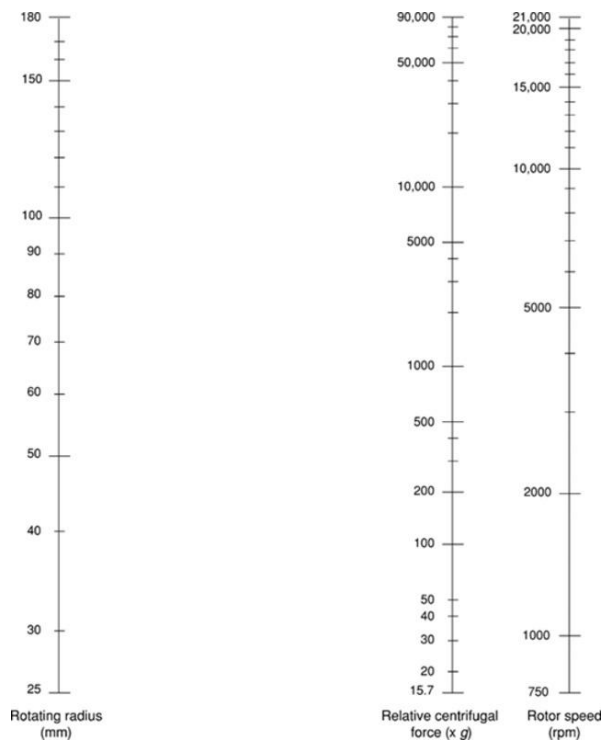
Pri odstreďovaní pôsobí na sedimentujúce častice odstredivá sila (P), ktorú je možné vyjadriť vzťahom:

$$P = m \times r \times \omega^2$$

kde m je hmotnosť častice, r je polomer otáčania a ω je uhlová rýchlosť. Pre praktické výpočty sa však zaviedla veličina relatívna centrifugačná sila RCF (relative centrifugation force), ktorá udáva, koľkokrát je zrýchlenie väčšie ako gravitačné zrýchlenie zeme g a je daná vzťahom:

$$RCF = 1,118 \times r \times N^2 \times 10^{-5}$$

kde N je počet otáčok za minútu (rpm) a r je polomer otáčania v cm. Relatívna centrifugačná sila sa uvádza ako základná charakteristika centrifugácie. Zo vzťahu je zrejmé, že iba údaj o počte otáčok za minútu proces centrifugácie necharakterizuje. Aby sa relatívna centrifugačná sila nemusela v každom prípade vypočítavať, výrobcovia často dodávajú k centrifúgam diagramy, z ktorých sa ľahko určia hodnoty RCF . Bežne sa relatívna centrifugačná sila odčíta aj z univerzálneho nomogramu (Obr. 21).



Obr. 21. Nomogram na výpočet relatívnej centrifugačnej sily RCF.

Dostupných je mnoho typov centrifúg, ktoré sa líšia veľkosťou (malé stolové až veľkoobjemové priemyselné), dosahovaným zrýchlením a tvarom rotorov (výkyvné a uhlové). Vo výkyvných rotoroch sú kvety uložené v puzdrách, ktoré sú voľne zavesené v čapoch vlastného rotora, a počas odstredovania sú vo vodorovnej polohe. Naproti tomu v uhlových rotoroch sú kvety fixované k osi otáčania v určitom uhle, zvyčajne 45 – 50°.

Zvláštnou kategóriou sú ultracentrifúgy, ktorých používaním je možné dosiahnuť relatívnu centrifugačnú silu 100.000 × g i viac. Od bežných centrifúg sa líšia tým, že priestor s rotorom musí byť pri odstredovaní v prostredí vákua. Používajú sa na delenie biopolymérov a subcelulárnych častíc v hustotnom gradiente sacharózy alebo CsCl. Tieto techniky možno vykonávať v analytickom i v preparatívnom meradle. Analytické centrifúgy sú navyše vybavené optickým zariadením, ktoré umožňuje sledovať rozhranie tvorené jednotlivými sedimentujúcimi látkami.

Počas laboratórnych cvičení budete používať malú stolovú centrifúgu (Obr. 22). Centrifugované vzorky je do rotora potrebné vkladať tak, aby bol rotor vyvážený. Odstredivé sily, ktorými jednotlivé vzorky pôsobia na hriadeľ rotora, sa musia vzájomne rušiť. V praxi to znamená, že je potrebné vzorky do rotora vkladať tak, aby v protíahlych pozíciách boli vždy dve rovnako ťažké skúmavky. Každá nepresnosť v dynamickom aj statickom vyvážení sa mnohonásobne prejaví zväčšením odstredivého tlaku na jednu

stranu osi. Os sa nerovnovážnym zaťažením ľahko ohne alebo sa poškodí ložisko. Pri chode centrifúgy sa pri nepresnom vyvážení prejavujú silné vibrácie. Čím väčšia rýchlosť otáčania sa použije, tým presnejšie sa musí rotor vyvážiť. Pri nízkych otáčkach postačí použiť na všetky vzorky skúmavky rovnakého typu a napipetovať do nich rovnaké objemy vzoriek. Pri ultracentrifugácii sa skúmavky vážia a objem vzorky sa upravuje tak, aby protiľahlé skúmavky mali identickú hmotnosť.

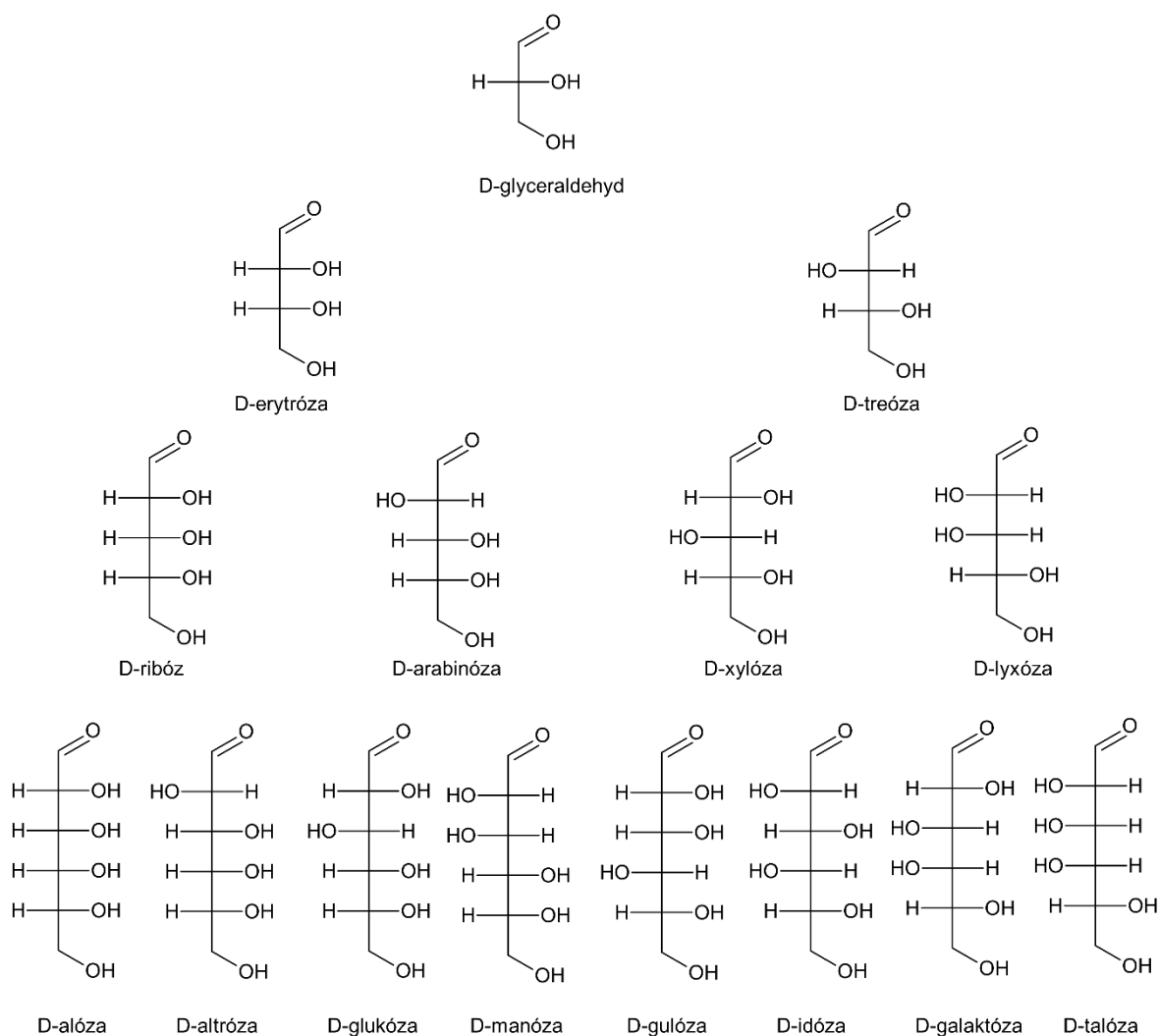


Obr. 22. Centrifúga Hettich Eba 200 s uhlovým rotorom používaná v Laboratóriu organickej chémie a biochémie.

2. Sacharidy

Sacharidy sú prírodné organické látky, ktoré vznikajú počas fotosyntézy. Vo svojej molekule obsahujú atómy uhlíka, vodíka a kyslíka v pomere 1:2:1. Z chemického hľadiska sacharidy definujeme ako polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketóny. Spolu so svojimi derivátmi sa vyskytujú vo všetkých rastlinných aj živočíšnych bunkách, kde majú rôzne funkcie. Sacharidy: (1) sú dôležitým a ľahko dostupným zdrojom energie (uvoľňuje sa pri ich oxidácii), (2) sú stavebnými zložkami buniek a tkanív (celulóza, chitín), (3) tvoria zásobné látky (glykogén, škrob) a (4) sú zložkami nukleotidov a iných účinných látok (koenzýmy, antibiotiká).

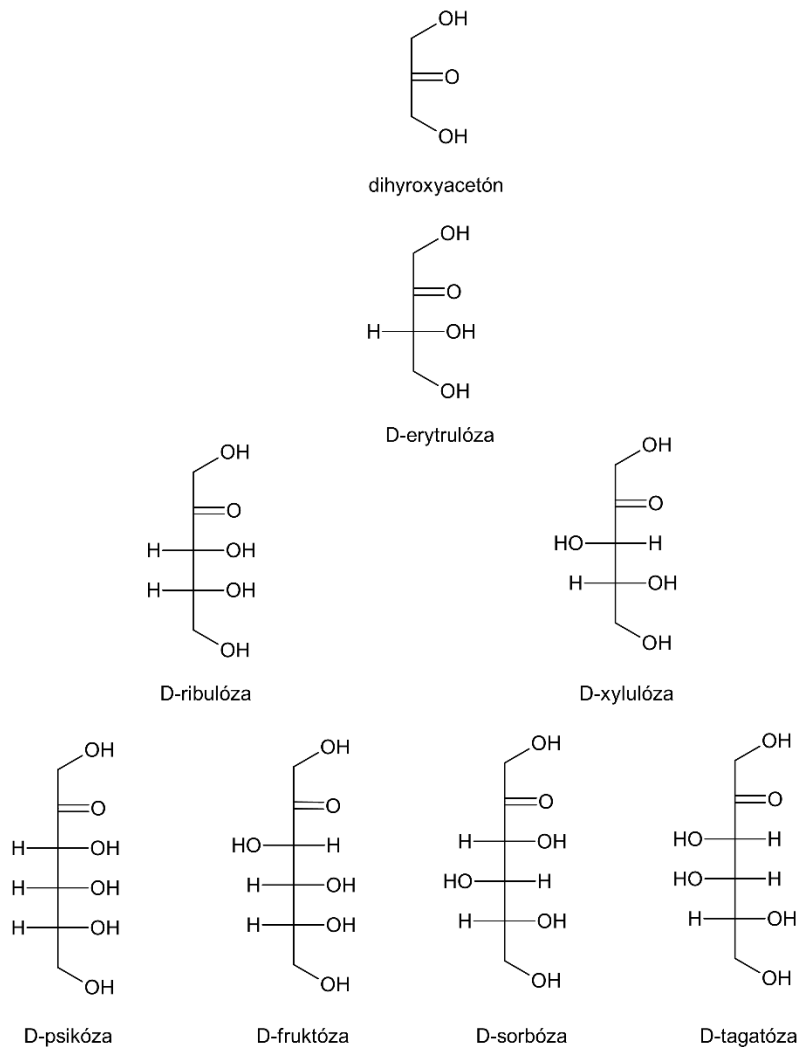
Monosacharidy – sú najjednoduchšie sacharidy a v zásade ide o aldehydy alebo ketóny, ktoré obsahujú dve a viac hydroxylových skupín. Empirický vzorec väčšiny monosacharidov je $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Podľa funkčnej skupiny ich delíme na aldózy (funkčná skupina CHO) a ketózy (funkčná skupina $\text{C}=\text{O}$). Najjednoduchšie sacharidy majú v molekule tri uhlíky (triózy, $n = 3$, glyceraldehyd – aldóza, dihydroxyacetón – ketóza). Sacharidy so štyrmi, piatimi, šiestimi a siedmimi uhlíkovými atómami sa označujú ako tetrózy, pentózy, hexózy a heptózy (Obr. 23, 24).



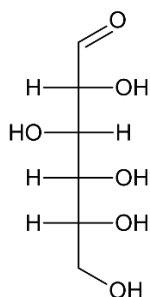
Obr. 23. D-aldózy.

Uhlíkové atómy monosacharidov sa čísľujú tak, aby karbonylová skupina mala čo najnižšie číslo. Chiralita skupín CHOH spôsobuje izomériu monosacharidov určitého typu. Počet možných

stereoizomérov (n) je daný počtom centier chiralít (x); $n = 2^x$, takže možno napr. odvodiť 8 izomerických aldohexóz ($x = 4$), z ktorých každá tvorí dva enantioméry. Základom pre rozlíšenie enantiomérov je systém D / L, pričom rozhodujúca je zhoda konformácie na uhlíku s najvyšším poradovým číslom s konformáciou jedného z dvoch enantiomérov aldotriózy, glyceraldehydu. Podľa tejto predstavy možno štruktúru monosacharidov znázorniť lineárnymi Fischerovými vzorcami (Obr. 25).



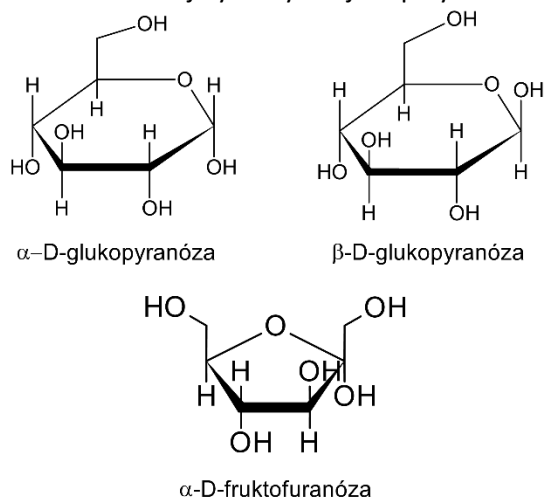
Obr. 24. D-ketózy.



Obr. 25. Glukóza vo Fisherovej projekcii.

Tieto vzorce však nevystihujú presne štruktúru a niektoré chemické vlastnosti monosacharidov. Dôvodom je, že molekuly sacharidov nie sú lineárne, ale cyklické. Vo všeobecnosti aldehydová skupina reaguje s hydroxylovou skupinou na tej istej molekule za vzniku intramolekulového hemiacetálu.

V prípade glukózy tak vzniká šesťčlánkový kruh podobný pyránu - pyranóza. Podobne reaguje ketónová skupina s hydroxylovou skupinou za vzniku intramolekulového hemiketálu. V prípade fruktózy vzniká päťčlánkový kruh podobný furánu – furanóza. Väčšina monosacharidov existuje voľne v podobe pyranóz, iba niektoré poznáme aj vo forme furanózy, najmä ako zložky oligo- a polysacharidov. Cyklické formy monosacharidov sa zobrazujú Haworthovými projekčnými vzorcami (Obr. 26). Podľa polohy hydroxylovej skupiny na prvom uhlíku rozlišujeme α a β formy – tzv. konfiguračné izoméry (anoméry). Označenie α znamená, že hemiacetálová hydroxylová skupina sa nachádza pod rovinou kruhu, označenie β indikuje polohu hemiacetálovej hydroxylovej skupiny nad rovinou kruhu.



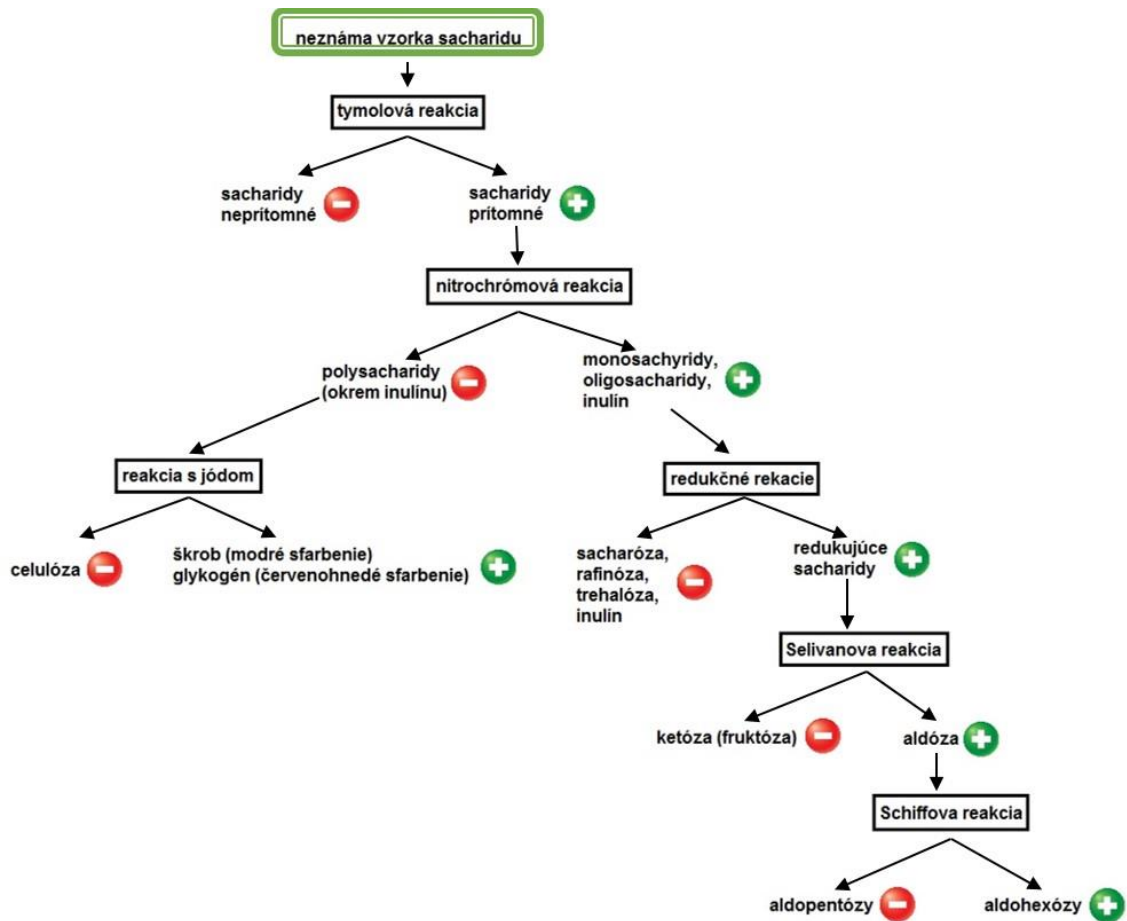
Obr. 26. Cyklické formy monosacharidov – Haworthove projekčné vzorce.

Monosacharidy sú biele kryštalické látky rozpustné vo vode a takmer nerozpustné v organických rozpúšťadlách. Pri zahrievaní dochádza k ich topeniu, pri vyšších teplotách hnednú (karamelizujú). Roztoky monosacharidov majú sladkú chuť a zvyčajne otáčajú rovinu polarizovaného svetla - sú opticky aktívne. V súčasnej dobe je známych viac ako 100 v prírode sa vyskytujúcich monosacharidov, a to v jednoduchej forme (glukóza a niektoré ketózy) alebo ako zložky oligo- a polysacharidov. Okrem toho sú monosacharidy zložkami tiež glykozidov, nukleotidov, glykolipidov alebo glykoproteínov. Metabolickou formou monosacharidov sú ich fosforečné estery. Z biochemického hľadiska sú významné najmä hexózy a pentózy, medzi ktoré patrí napr. glukóza, fruktóza, galaktóza, manóza a ribóza.

Oligosacharidy – sú tvorené dvoma až desiatimi monosacharidmi, ktoré sú spojené α - alebo β -O-glykozidovou väzbou. V závislosti od počtu monosacharidových podjednotiek, na ktoré môžu byť rozložené kyslou alebo enzýmovú hydrolýzou, ich delíme na di-, tri-, tetrasacharidy atď. Oligosacharidy sú značne rozšírené v rastlinnej aj živočíšnej ríši. Vyskytujú sa pritom vo voľnej i viazanej forme. Významné sú najmä disacharidy (Obr. 27), ktoré sú tvorené rovnakými alebo rozdielnymi monosacharidovými jednotkami spojenými O-glykozidovou väzbou.

Podľa typu väzby rozlišujeme disacharidy redukujúce, kedy je do väzby zapojený iba jeden poloacetalový hydroxyl, zatiaľ čo druhý je voľný (napr. laktóza alebo maltóza). Redukujúci disacharid má teda jednu voľnú reaktívnu hydroxylovú skupinu s redukčnými vlastnosťami, schopnosťou mutarotácie a tvorí taktiež osazóny a oxímy. Druhou skupinou sú neredukujúce sacharidy, kde sa oba poloacetalové hydroxyly zúčastňujú glykozidovej väzby. Príkladom je sacharóza a trehalózy. Neredukujúce sacharidy strácajú schopnosť poskytovať typické reakcie jednoduchých cukrov ako sú redukcia, tvorba osazónov a mutarotácia. Disacharidy sú zložkou potravy, nie sú však všeobecne vstrebávané z čreva, a musia byť preto v jeho stene hydrolyticky štiepené na svoje monosacharidové jednotky.

V tomto cvičení budete mať za úlohu identifikovať sacharidy z neoznačených vzoriek a to sériou kvalitatívnych reakcií, pričom na ich určenie použijete schému na Obr. 30.



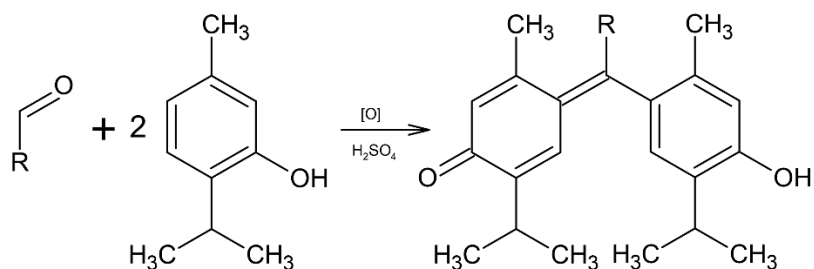
Obr. 30. Schéma na identifikáciu sacharidov.

Pomôcky: stojany so skúmavkami, držiaky na skúmavky, kadičky, automatické pipety, špičky, sklenené pipety, kvapkadlá (Pasteurove pipety), elektrický varič

Chemikálie a reagenty: vid' príslušná reakcia, neoznačené kadičky s roztokom glukózy, fruktózy, arabinózy, sacharózy, škrobu, celulózy a kadička s vodou

Tymolová reakcia

Skupinová reakcia na sacharidy. Dehydratáciou sacharidov vznikajúce furfuraly dávajú s tymolom červené sfarbenie (Obr. 31). Reakcia nie je špecifická. Dávajú ju aj glykoproteíny a indoxyl.



Obr. 31. Reakcia furfuralu s tymolom.

Reagencie: 3 % tymol v etanole, koncentrovaná kyselina sírová

Pracovný postup: Do 1 ml roztoku sacharidu sa pridajú 2 kvapky tymolu a prevrství sa 2 ml kyseliny sírovej. Opatrným varením (1 – 3 min) vzniká stále tmavočervené sfarbenie.

Nitrochrómová reakcia

Skupinová reakcia na mono a oligosacharidy. Spočíva v reakcii skupiny =CH-OH s koncentrovanou kyselinou dusičnou a chrómanom draselným, pričom vzniká modré sfarbenie. Nie je špecifická len pre sacharidy.

Reagencie: koncentrovaná kyselina dusičná, 5% chróman draselný

Pracovný postup: Do 1 ml roztoku sacharidu sa opatrne pridajú 3 ml kyseliny dusičnej a po stene skúmavky 3 kvapky chrómanu draselného. Po dôkladnom premiešaní sa asi po 1 min roztok sfarbí na modro.

Dôkaz redukujúcich sacharidov

Povarením mono- a disacharidov obsahujúcich voľnú poloacetálovú hydroxyskupinu v silne alkalickom prostredí vznikajú ako medziprodukty tzv. reduktóny, ktoré redukujú komplexne viazané ióny ťažkých kovov (Cu^{2+} , Bi^{3+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ag^{+}) a tiež niektoré iné látky (kyselina pikrová, metylénová modrá).

Fehlingová reakcia

Redukujúce sacharidy redukujú hydroxid meďnatý na červený oxid meďný. Hydroxid meďnatý sa stabilizuje vínanom sodno-draselným, takže po zahriatí sa vyzráža čierny oxid meďnatý. Aj za studena dobre reaguje kyselina glukurónová a galakturónová. Reakcia je pozitívna aj za prítomnosti kyseliny močovej, kreatinínu a chloroformu.

Reagencie: Fehling I – 4 % síran meďnatý, Fehling II – 346 g vínan sodno-draselného a 120 g NaOH sa rozpustí v 1 l destilovanej vody

Pracovný postup: V skúmavke zmiešajte 1 ml vzorky s 0,5 ml roztoku Fehling I a 0,5 ml roztoku Fehling II. Opatrne zahrievajte, v prípade pozitívnej reakcie vzniká červená zrazenina Cu_2O .

Selivanova reakcia

Dôkaz ketóz - ketohexózy zahriatím so zriedenou kyselinou chlorovodíkovou dávajú oxymetylfurfural, ktorý sa s rezorcínom sfarbí na višňovo-červeno. Reakcia nie je špecifická. Je pozitívna aj pri vyššom obsahu glukózy (viac ako 2 %). Niekedy sa tvorí hnedá zrazenina, ktorá sa rozpúšťa v etanole. Až potom sa hodnotí sfarbenie roztoku.

Reagencie: Selivanova reagentia – rezorcín 0,05 g v 99,5 ml 12 % kyseliny chlorovodíkovej

Pracovný postup: Vo vriacom vodnom kúpeli zahrievajte súčasne 0,5 ml vzorky sacharidu s 2 ml Selivanovej reagentie. Prítomnosť ketóz sa prejaví višňovo-červeným sfarbením už po 1 minúte. Aldózy reagujú slabo a až po dlhšej dobe.

Reakcia s jódom

Roztok jódu sa využíva na dôkaz škrobu. Nerozvetvená časť škrobu (amylóza) vytvára závitnice, v ktorých sa zhromažďuje jód, čím vzniká charakteristické tmavomodré sfarbenie. Naproti tomu amylopektín (rozvetvená časť) tvorí oveľa kratšie závitnice, v ktorých sa jód nezhrromažďuje v potrebnej koncentrácii, výsledkom čoho je oranžové sfarbenie roztoku.

Reagencie: 0,3 % jód v 5 % jodide draselnom

Pracovný postup: Do skúsanej vzorky sa pridá niekoľko kvapiek reagentie. So škrobom vzniká modré sfarbenie.

Schiffova reakcia

Pentózy sa dehydratujú minerálnymi kyselinami na fural, ktorý možno vydestilovať z reakčnej zmesi, a dokázať pomocou anilínu. Vzniká intenzívne karmínovočervené sfarbenie furanilínu.

Reagencie: koncentrovaná kyselina chlorovodíková, roztok octanu anilínu (1 mól anilínu sa zmieša s 1 móлом kyseliny octovej)

Pracovný postup: 1 – 2 ml roztoku obsahujúceho pentózu zahrievajte až do varu s rovnakým objemom koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Keď pri ústí skúmavky pridržíte niekoľko minút prúžok filtračného papiera, namočeného do roztoku octanu anilínu, na papieriku sa objaví červené sfarbenie.

Vyhodnotenie výsledkov:

1. Všetky vykonané kvalitatívne reakcie sumarizujte v prehľadnej tabuľke; v záhlaví uveďte vodorovne číslo kadičky s neznámou vzorkou a zvisle názov reakcie. Výsledky reakcií označíte nasledovne: (+) pozitívna (pozorované príslušné sfarbenie), (-) negatívna.
2. Na základe výsledkov určíte zloženie neznámej vzorky.

Úloha 5. Separácia sacharidov tenkovrstvovou chromatografiou

Chromatografia na tenkej vrstve je vhodná na analytické, ale aj preparatívne účely. Na analytické účely sú vhodné najmä hotové analytické platne Silufol alebo Alufol. Chromatografické platne Silufol sú hliníkové fólie s rozmerom 15 x 15, prípadne 20 x 20 cm, na ktorých je nanosená vrstva silikagélu, a ako spojivo je použitý škrob. Chromatografické platne s označením Silufol 254 obsahujú fluorescenčný indikátor a možno na nich UV svetlom detekovať bezfarebné látky. Jednotlivé škvrny sa vo svetle UV lampy prejavia fluorescenciou alebo zhášaním. Chromatografické platne Alufol obsahujú ako adsorbent oxid hlinitý so spojivom. Chromatografia na tenkej vrstve (TLC – thin-layer chromatography) je jednou z modifikácií adsorpčnej chromatografie a je pomocou nej možné rýchlo a ľahko analyzovať čistotu látok. Použitím vhodných štandardov je možné zároveň jednotlivé látky v zmesi aj identifikovať.

Pomôcky: silufolové platne, automatické mikropipety, rozprašovač, sušiareň, chromatografická komôrka s vrchnákom

Chemikálie: mobilná fáza, detekčné činidlo, štandardné roztoky cukrov (2 – 3 g/l), neznáma vzorka

Mobilná fáza: zmes bután-1-olu, kyseliny octovej a vody v pomere 4:1:5. Zmes dôkladne pretrepte a použite vrchnú (organickú) fázu

Detekčné činidlo: 1 ml anilínu, 1 g difenylamínu, 10 ml 85 % kyseliny fosforečnej a 100 ml acetónu

Pracovný postup: Pripravte si roztoky nasledovných štandardov – D-glukóza, laktóza, maltóza, D-fruktóza a D-arabinóza. Na chromatografickú platňu s rozmermi 10 × 10 cm si 15 mm od spodného okraja ceruzkou nakreslite štartovaciu čiaru. 15 mm od ľavého okraja označte rovnomerne od seba 6 bodov. Na prvých päť z nich naneste po 3 µl štandardných roztokov sacharidov. Je vhodné nanášať koncentrované roztoky, aby škvrna delenej zmesi bola čo najmenšia. Šiesty bod je určený pre 3 µl vzorky. Roztoky nanášajte opatrne automatickou pipetou. Pripravenú platňu vložte do chromatografickej komory s mobilnou fázou (nesmie byť vyššie ako 1 cm od spodného okraja platne), prikryte vrchnákom a nechajte vyvíjať dovtedy, kým sa čelo nepriblíži na 1 cm od horného okraja platne. Chromatogram vyberte, ceruzkou označte

čelo a platňu vysušte. Po usušení vytvorený chromatogram v digestore postriekajte detekčným činidlom a vložte do sušiarne vyhriatej na 100 °C. Po chvíli sa objavia farebné škvrnky jednotlivých cukrov. Upozornenie: platne nezahrievajte dlhšiu dobu v sušiarňi!

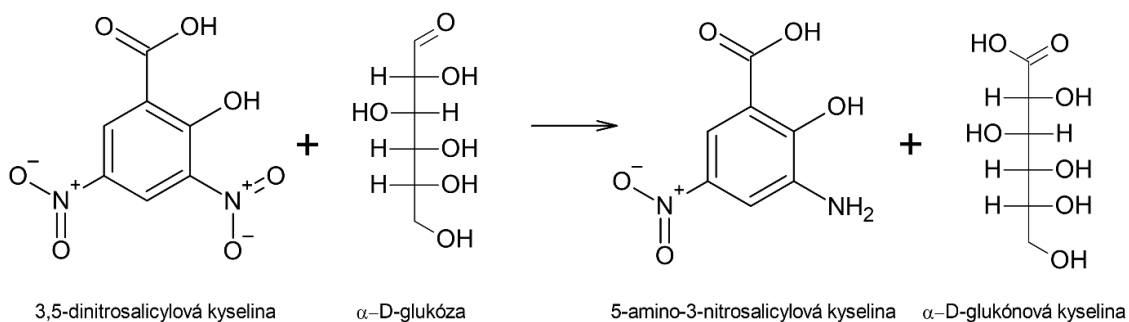
Vyhodnotenie výsledkov:

1. Porovnaním farebných škvŕn štandardov a vzorky určíte, ktorý sacharid sa vo vzorke nachádzal.
2. Na vyhodnotenie môžete použiť aj porovnanie hodnôt retenčných faktorov R_f pre jednotlivé štandardy a neznámu vzorku. R_f hodnoty vypočítate ako podiel vzdialenosti stredu škvŕny (označte ceruzkou) od štartu (A) a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu (B): $R_f = A/B$. Retenčný faktor je funkciou adsorpčnej schopnosti stacionárnej fázy a pre danú látku závisí od systému, v ktorom je analyzovaný, teda od teploty, druhu adsorbentu a zloženia mobilnej fázy.
3. Porovnajete oba spôsoby vyhodnotenia výsledkov.

Úloha 6. Stanovenie redukujúcich sacharidov metódou DNS

Redukčné vlastnosti voľnej poloacetálovej hydroxyskupiny ($-C=O$) redukujúcich sacharidov je možné využiť na ich kvantitatívne stanovenie. Pri týchto reakciách sa aldehydová skupina aldóz oxiduje na karboxyl a v prípade ketóz nastáva oxidácia na hydroxyl. Sacharidy, ktoré nemajú voľnú poloacetálovú skupinu (napr. sacharóza), tento typ reakcie neposkytujú. Reakcia redukujúcich sacharidov s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou (DNS) v alkalickom prostredí patrí k najznámejším reakciám tohto typu. Vzniká pri nej žlto-sfarbený produkt – redukovaná forma DNS (kyselina 3-amino-5-nitrosalicylová), ktorého absorbanciu meriame pri vlnovej dĺžke 540 nm.

Reakcia glukózy s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou za vzniku kyseliny 3-amino-5-nitrosalicylovej a glukónovej kyseliny je uvedená na Obr. 32.



Obr. 32. Reakcie glukózy s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou.

Pomôcky: kadičky, stojan so skúmavkami, odmerné banky, automatické pipety s nastaviteľným objemom, pipetovacie špičky (modré a žlté), vodný kúpeľ, elektrický varič, analytické váhy, vortex, spektrofotometer

Chemikálie: zásobný roztok glukózy s koncentráciou 5 g/l, DNS reagentia (2 g DNS rozpustíte v 40 ml roztoku NaOH s koncentráciou 2 mol/l a doplňte do 100 ml destilovanou vodou, pridajte 60 g vlnanu sodno-draselného a do 200 ml doplňte destilovanou vodou), vzorka s neznámou koncentráciou glukózy (napr. krabičkový ovocný džús)

Pracovný postup: K 0,8 ml DNS reagentie napipetujte 100 μ l vzorky a povarte 5 minút vo vriacom vodnom kúpeli. Následne pridajte 8 ml destilovanej vody a 30 sekúnd dôkladne premiešajte na vortexe. Absorbanciu ochladených vzoriek merajte spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 540 nm (**upozornenie:** postupujte podľa návodu na obsluhu spektrofotometra uvedeného v úlohe 3!). Na zostrojenie kalibračného grafu použite ako štandard redukujúcich sacharidov roztoky glukózy s koncentráciami 1 – 5 g/l, ktoré pripravíte nariedením zásobného roztoku o koncentrácii 5 g/l (Tabuľka 1).

Tabuľka 1.

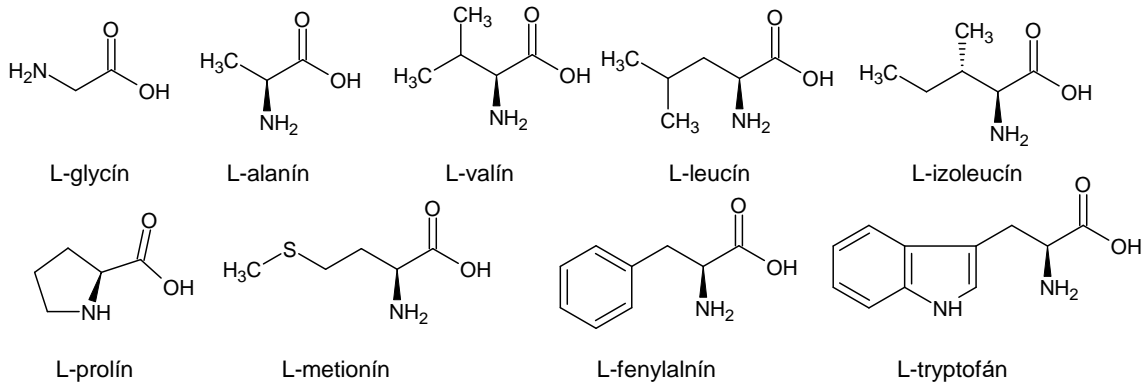
Skúmavka č.	1	2	3	4	5	Vzorka
Zásobný roztok glukózy 5 g/l (ml)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	-
Destilovaná H ₂ O (ml)	4,0	3,0	2,0	1,0	0	-
Koncentrácia glukózy (g/l)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	-
Štandard glukózy (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
DNS (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	Povariť 5 minút, pridať 8 ml destilovanej vody a premiešať na vortexe. Zmerať absorbanciu pri 540 nm.					
Absorbancia pri 540 nm						

Vyhodnotenie výsledkov: Z nameraných hodnôt absorbičností štandardných roztokov glukózy zostrojíte graf $A = f(c)$ (závislosť absorbičností štandardného roztoku glukózy pri 540 nm od koncentrácie glukózy) a použitím lineárnej regresie určíte regresné koeficienty **a**, **b** a koeficient determinácie R^2 . Následne na základe nameraných absorbičností vzorky a rovnice kalibračnej priamky vypočítajte koncentráciu redukujúcich sacharidov (g/l) vo vzorke s neznámou koncentráciou glukózy.

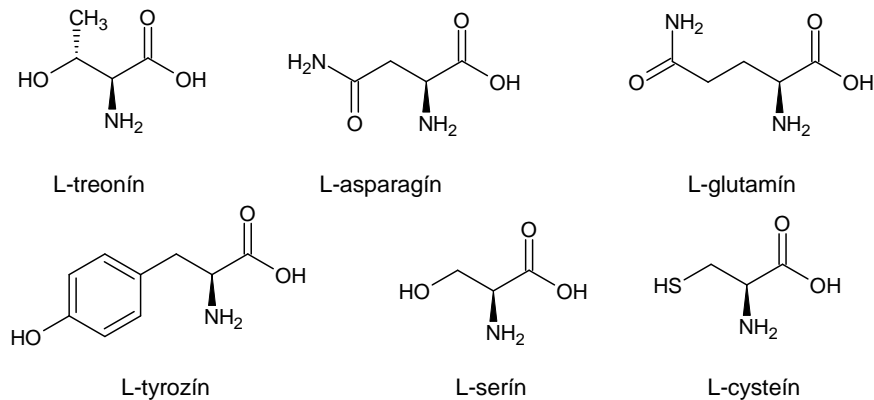
3. Aminokyseliny a proteíny

Všetky proteíny na Zemi sa skladajú z dvadsiatich základných proteinogénnych aminokyselín (Obr. 33). S výnimkou prolínu ide o α -aminokyseliny. Prolín obsahuje sekundárnu aminoskupinu, a je tak vlastne α -iminokyselina. Proteinogénne aminokyseliny rozdeľujeme podľa charakteru bočného reťazca na neutrálne, zásadité a kyslé. Takéto delenie nie je ani tak podstatné pre samotné aminokyseliny, ale najmä pre charakterizáciu proteínov, ktoré sú aminokyselinami tvorené. Hydrofóbne postranné reťazce aminokyselín v proteínoch odpudzujú vodu a naopak hydrofilné sú vodou solvatované.

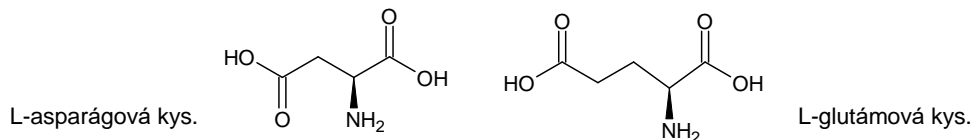
Nepolárne



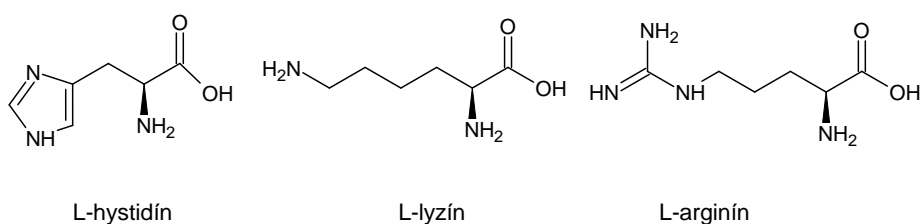
Polárne



Kyslé



Zásadité



Obr. 33. Proteinogénne aminokyseliny.

Aminokyseliny sú pevné kryštalické látky, ľahko sa rozpúšťajú v polárnych rozpúšťadlách (voda, etanol), v nepolárnych rozpúšťadlách sú nerozpustné. α -aminokyseliny sa v roztoku pri neutrálnom pH vyskytujú ako amfión (zwitterion), ktorého náboj je intramolekulovo neutralizovaný (aminoskupina je protonizovaná NH_3^+ a karboxylová skupina je disociovaná COO^-).

Celkový náboj aminokyseliny (súčet všetkých prítomných záporne a kladne nabitých skupín) závisí na koncentrácii protónov v roztoku. Schopnosť meniť náboj aminokyselín zmenou pH sa využíva pri separácii proteínov. Hodnota pH, pri ktorej nemá aminokyselina žiadny náboj, sa nazýva izoelektrický bod. Aminokyseliny, s výnimkou glycínu, sú opticky aktívne látky, to znamená, že otáčajú rovinu polarizovaného svetla. Molekuly sa rozdeľujú na pravotočivé (+) a ľavotočivé (-). Aminokyseliny majú na α -uhlíku chirálne centrum a všetky aminokyseliny nachádzajúce sa v proteínoch majú L-konfiguráciu. Teda fyziologicky využiteľné sú len L-formy aminokyselín.

Úloha 7. Identifikácia aminokyselín v neznámej vzorke

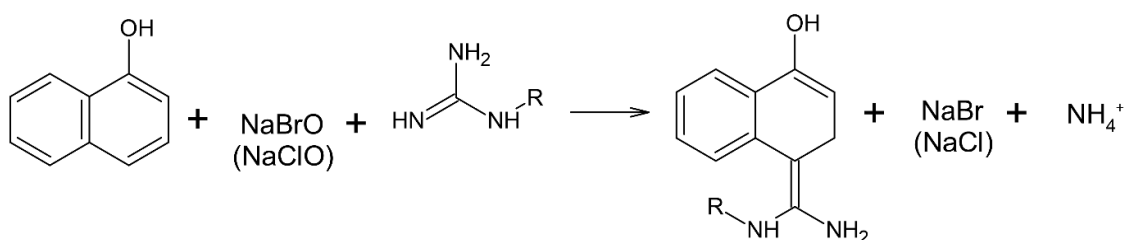
Okrem acidobazických a optických vlastností sú niektoré aminokyseliny charakteristické chemickými reakciami vedľajších reťazcov, ktoré môžu byť do istej miery využité na ich identifikáciu, prípadne stanovenie. Pomocou nasledujúcich reakcií určite, ktoré aminokyseliny sa nachádzajú v neznámej vzorke.

Pomôcky: kadičky, stojan so skúmavkami, automatické pipety s nastaviteľným objemom, pipetovacie špičky (modré a žlté), vodný kúpeľ, elektrický varič, vortex

Chemikálie: roztoky neznámych vzoriek aminokyselín a 1 % roztoky glycínu, tyrozínu, tryptofánu, prolínu, arginínu, 10 % NaOH, 0,2 % ninhydrín, 0,2 % α -naftol v etanole, chlórnan sodný/brómnan sodný, Paulyho činidlo I, Paulyho činidlo II, 1,5M Na_2CO_3

Sakaguchiho reakcia

Pôsobením zásaditého brómnanu (prípadne chlórnanu) a α -naftolu na guanidínovú zložku arginínu vzniká charakteristické červené sfarbenie vzniknutého produktu oxidácie - substituovaného 1,4-naftochinónu (Obr. 34).

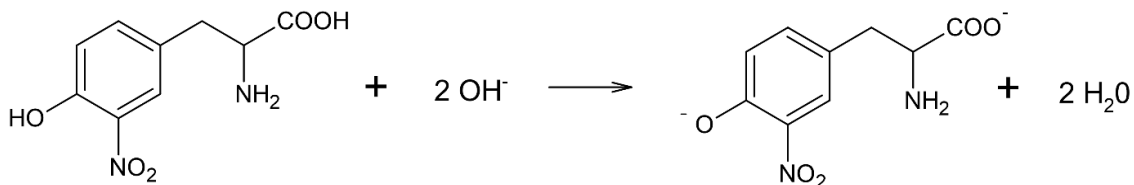


Obr. 34. Sakaguchiho reakcia.

Pracovný postup: Pre reakciu použite roztoku arginínu, glycínu a neznámu vzorku (poskytne vyučujúci). K 1 ml roztoku aminokyseliny pridajte 6 kvapiek 10 % roztoku NaOH. Následne pridajte 0,5 ml 0,2 % etanolového roztoku α -naftolu a 6 kvapiek brómnanu sodného, resp. chlórnanu sodného. Po premiešaní vzniká červené sfarbenie roztoku, v prípade negatívnej reakcie ostáva roztok sfarbený na žltó.

Xantoproteínová reakcia

V prípade tejto reakcie spočíva dôkaz v nitrácii aromatického jadra príslušných aromatických aminokyselín (tryptofán, tyrozín a fenylalanín). Pôsobením kyseliny dusičnej nastáva nitrácia aromatického jadra za vzniku žltých nitrozlučenín. Pôsobením alkálií sa žlté zafarbenie mení na oranžové (vzniká soľ aciformy nitrozlučeniny) (Obr. 35).

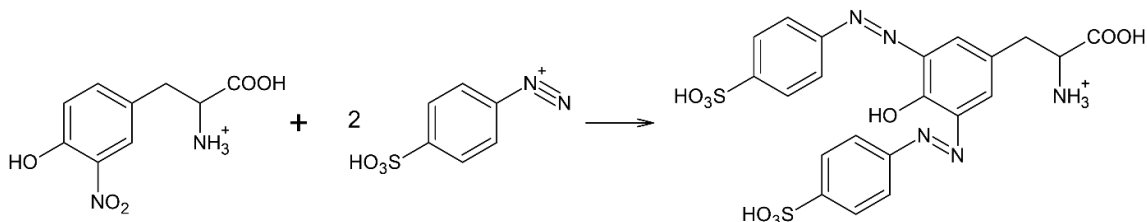


Obr. 35 Xantoproteínová reakcia.

Pracovný postup: Pre reakciu použite roztoky tyrozínu alebo tryptofánu, glycínu a neznámej vzorky (poskytnite vyučujúci). Vo vodnom kúpeli zahrejte 1 ml roztoku aminokyseliny s 0,5 ml koncentrovanej kyseliny dusičnej, vznikne žlté sfarbenie, prípadne zrazenina. Obsah skúmavky alkalizujte 20 kvapkami 10 % NaOH, farba sa zmení na oranžovú až červenú. V prípade negatívnej reakcie k farebným zmenám nedochádza.

Paulyho reakcia

Pri reakcii tyrozínu a histidínu s diazotovanou kyselinou sulfanilovou v alkalickom prostredí vznikajú oranžové až červené kopulačné produkty (azofarbivá) (Obr. 36).

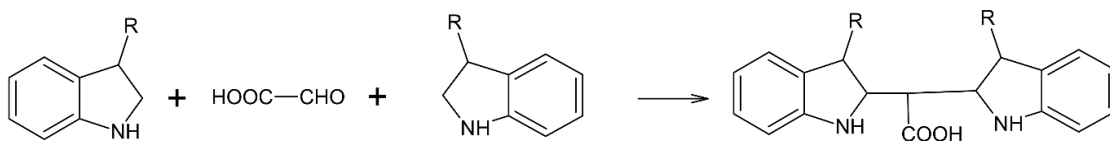


Obr. 36. Vznik azofarbív pri Paulyho reakcii.

Pracovný postup: Pre reakciu použite roztoky tyrozínu, glycínu a neznámej vzorky (poskytnite vyučujúci). V skúmavke zmiešajte 1 ml Paulyho činidla I s 2 ml Paulyho činidla II. Následne k 1 ml roztoku aminokyseliny pridajte 0,5 ml pripraveného Paulyho činidla. Roztok alkalizujte 4 kvapkami 1,5 M uhličitanu sodného. Po pretrepaní vznikajú oranžovo červené kopulačné produkty.

Adamkiewiczova reakcia

Princípom tohto dôkazu je reakcia indolového jadra tryptofánu s kyselinou glyoxylovou v prostredí koncentrovanej kyseliny sírovej za vzniku červenofialového zafarbenia (Obr. 37). Reakcia je citlivá a postačujú k nej stopy kyseliny glyoxylovej v staršej kyseline octovej, kde vzniká jej oxidáciou.

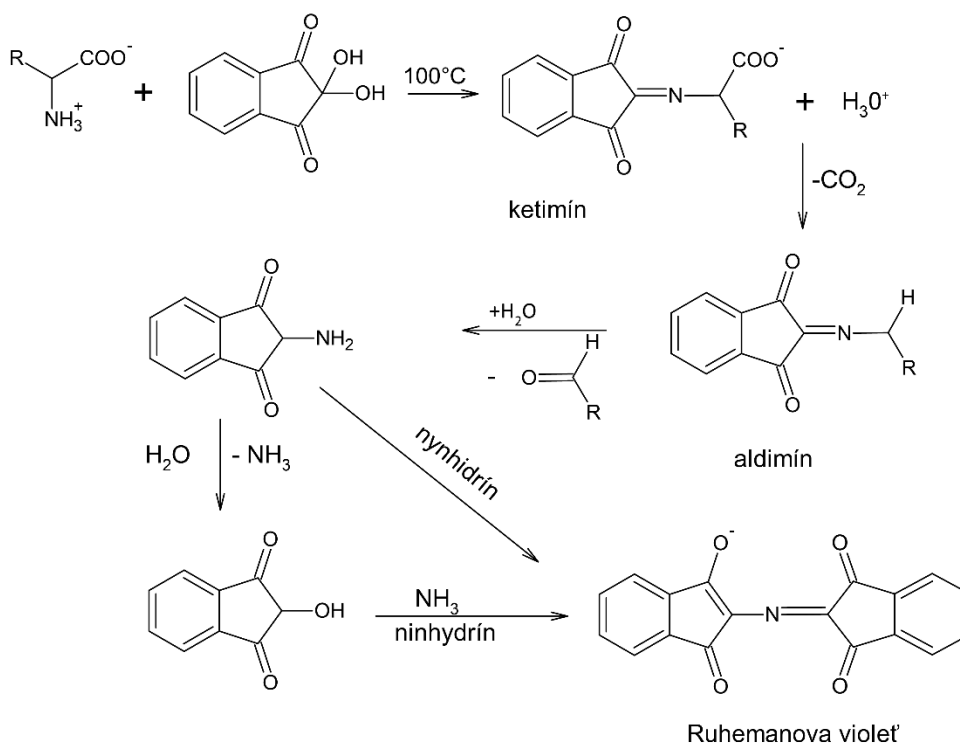


Obr. 37. Adamkiewiczova reakcia.

Pracovný postup: Na reakciu použite roztoky tryptofánu, glycínu a neznámej vzorky (poskytne vyučujúci). Do skúmavky s 0,5 ml roztoku aminokyseliny pridajte 0,5 ml kyseliny octovej, ktorá obsahuje kyselinu glyoxylovú. Obsah skúmavky dôkladne premiešajte. Veľmi opatrne v naklonenej skúmavke roztok podvrstvíte 1 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Po chvíli sa na rozhraní oboch kvapalín objaví žltohnedý prstenec.

Ninhydrínová reakcia

Pri oxidačno-redukčnej reakcii ninhydrínu (2,2-dihydroxy-1,3-indandión) s voľnými amino- a imino- skupinami vznikajú farebné produkty. Reakciou s primárnymi aminoskupinami modrofialový, ktorý sa nazýva Ruhemanova violet' ($\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$) (Obr. 38). Reakciou s iminoskupinami, napr. v prípade prolínu a jeho derivátov, žltý ($\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$). V peptidoch a proteínoch, kde sú aminokyseliny viazané peptidovou väzbou, reaguje iba voľná ϵ -aminoskupina lyzínu (Lys). Zvýšenie citlivosti reakcie možno dosiahnuť pridaním čiastočne redukovaného ninhydrínu – hydrindantínu. Ten reaguje s amoniakom uvoľneným pri reakcii za výrazného prehĺbenia sfarbenia.



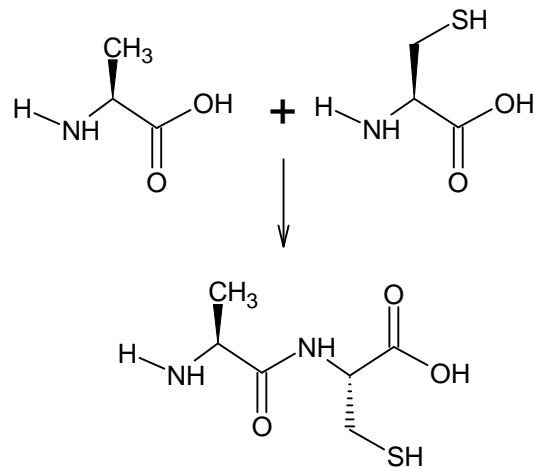
Obr. 38. Ninhydrínová reakcia.

Pracovný postup: V reakcii použite roztoky prolínu, glycínu a neznámej vzorky (poskytne vyučujúci). K 1 ml roztoku aminokyseliny pridajte 1 ml roztoku ninhydrínu a povarte. Asi po dvojminútovom varení vzniká tmavomodré sfarbenie roztoku s aminokyselinou. Prolín poskytuje žlté sfarbenie.

Vyhodnotenie výsledkov

1. Do tabuľky prehľadne uvediete výsledky vykonaných chemických reakcií.
2. Identifikujte zloženie aminokyselín v neznámej vzorke a zdôvodnite, na základe čoho ste určili o aké aminokyseliny sa jedná.

V **proteínoch** sú aminokyseliny viazané peptidovou väzbou, vznik ktorej je znázornený prostredníctvom kondenzácie dvoch aminokyselín (alanín a cysteín):



V dôsledku rezonancie má peptidová väzba charakter čiastočne dvojitej väzby (približne 40 %). Dôsledkom toho je, že rotácia tejto väzby je obmedzená s veľkou tendenciou nadobúdať planárny charakter. Sú možné dve konfigurácie peptidovej väzby, pri ktorej sú atómy $C\alpha$ v *trans* alebo *cis* polohe. *Trans* poloha je zo sterických dôvodov výhodnejšia.

Proteíny sa líšia svojimi vlastnosťami podľa toho, akú úlohu v organizmoch zohrávajú. K hlavným biologickým funkciám proteínov patrí:

- **stavebná (štruktúrna)** – sú stavebnými látkami, napríklad keratín alebo kolagén. Proteíny sa podieľajú na stavbe kostí, svalov, vlasov, kože, nechtov a podobne. Sú súčasťou bunkových membrán,
- **transportná** – hemoglobín a myoglobín podieľajúce sa na transporte kyslíka v organizme sú proteínového pôvodu,
- **katalytická** – všetky enzýmy katalyzujúce biochemické reakcie sú proteíny,
- **regulačná** – mnohé signálne molekuly sú transmembránové bielkoviny, hormóny sú taktiež proteínovej povahy,
- **obranná** – protilátky sú vysokošpecifické proteíny rozpoznávajúce cudzie elementy ako vírusy, mikroorganizmy,
- **pohybová** – proteíny sú hlavným komponentom vo svaloch. Svalová kontrakcia je uskutočňovaná kĺzavým pohybom dvoch druhov proteínových filamentov.

Stanovenie celkovej koncentrácie proteínov v roztoku je jednou z najčastejšie vykonávaných analýz v biochemických laboratóriách. Napriek zdanlivej jednoduchosti sa však pri realizácii používaných metód stanovenia proteínov stretávame s viacerými problémami, ktoré často vedú k nesprávnym alebo nepresným výsledkom. Cieľom tejto úlohy je študentov podrobnejšie zoznámiť s najpoužívanejšími metódami stanovenia proteínov, ich výhodami i nevýhodami. Dnes sa v praxi výskumných i rutinných laboratórií používajú prakticky iba spektrofotometrické metódy. Z historických metód je potrebné zmieniť Kjeldahlovu a Dumasovu - ich použitie je však obmedzené veľkou prácnosťou a časovou náročnosťou už pri príprave vzoriek (dodnes slúžia ako základné referenčné metódy pre presnú analýzu proteínov, napr. obilných zŕn v potravinárstve). V súčasnosti je cieľom vzorku upravovať minimálne, aby jej analýza bola čo najrýchlejšia a najlacnejšia.

Spektrofotometrické metódy stanovenia proteínov delíme na **priame** – založené na spektrálnych vlastnostiach proteínov, a **nepriame** – založené na interakciách proteínu s činidlom, pri ktorých dochádza k zmene spektrálnych vlastností činidla.

a) Priame metódy

Meranie absorbancie v blízkej UV oblasti (vlnová dĺžka 280 nm)

Stanovenie proteínov v blízkej UV oblasti umožňuje prítomnosť chromofórov v molekulách proteínov, najmä tyrozínu a tryptofánu, s absorbným maximom 275 - 280 nm. Metóda je relatívne málo citlivá a vykazuje veľkú závislosť na aminokyselinovom zložení proteínov. Preto sa pre stanovenie koncentrácie proteínov nepoužíva, jej použitie je možné pre stanovenie čistoty nukleových kyselín (**viď úloha 15**), kedy sa interferencia proteínov (spôsobená prítomnosťou tyrozínu a tryptofánu) eliminuje meraním pri dvoch vlnových dĺžkach s následnou korekciou.

Meranie absorbancie v ďalekej UV oblasti (vlnová dĺžka 205 nm)

Meranie v ďalekej UV oblasti pri 205 nm je založené na absorpcii peptidovej väzby s $\lambda_{\max} = 192$ nm. Na meranie pri tejto vlnovej dĺžke je potrebné precízne voliť zloženie pufru. Vzorky je nutné zbaviť malých opaleskujúcich častíc centrifugáciou a vo vzorke je potrebné tiež na minimum znížiť obsah kyslíka. Na výpočet koncentrácie sa používa empirický vzorec:

$$c \text{ (mg/ml)} = A_{205} [27 + 120 (A_{280}/A_{205})]$$

Výhodou priameho merania proteínov v UV oblasti je nedeštruktívna analýza vzorky – po jej vykonaní je možné vzorku ďalej používať. Naopak, nevýhodou je nutnosť použitia kremenných kvýviet.

b) Nepriame metódy

Biuretova metóda

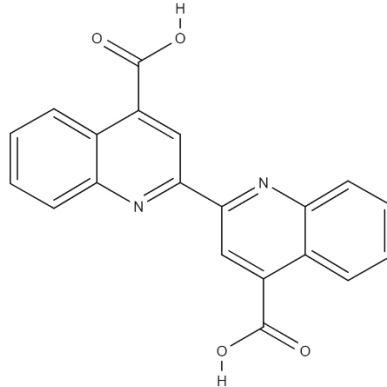
Metóda je založená na chelatácii Cu^{2+} iónov imidovými štruktúrami polypeptidu ionizovanými v silno alkalickom prostredí za vzniku červeno-fialového komplexu. So stanovením interferuje glukóza a iné med' redukujúce látky napr. proteíny bohaté na sulfhydrylové skupiny (keratín). Taktiež interferujú vysoké koncentrácie amónnych solí a niektoré fosfáty používané pri purifikácii proteínov. Biuretova metóda je vhodná pre vzorky obsahujúce proteín v koncentrácii 1 – 10 mg/ml, ktoré sa riedia 5 × pridaním činidla na výslednú koncentráciu proteínu 0,2 – 2 mg/ml. Väčšina proteínov poskytuje tmavo červené sfarbenie s maximom absorbancie pri 550 nm.

Lowryho metóda (Hartree-Lowryho metóda)

Lowryho metóda (1951) patrí k najcitovanejším prácam v biochémií a zároveň aj k najpoužívanejším metódam stanovenia koncentrácie proteínov. Ide o kolorimetrické stanovenie, založené na dvojzložkovom činidle. Prvou zložkou je Biuretovo činidlo a druhou Folin-Ciocalteuovo činidlo na fenoly obsahujúce polykyseliny fosfomolybdénové a fosfowolfrámové, ktoré sa redukujú tyrozínovými zvyškami proteínov za vzniku modrého sfarbenia. Lowryho metóda je citlivejšia (detekčný limit 0,1 – 0,6 g/l) ako Biuretova reakcia a stanovenie je lineárne v širšom koncentračnom rozsahu. Reakcia je veľmi citlivá na pH prostredia a preto je nutné udržiavať pH v rozmedzí 10,0 – 10,5 a na dosiahnutie reprodukovateľných výsledkov je taktiež potrebné dodržiavať jednotlivé časové intervaly pridávania a zmiešavania činidiel.

BCA metóda

V tejto metóde sa využíva kyselina bicinchonínová (BCA, Obr. 39) na spektrofotometrické stanovenie celkových proteínov, ktoré je založené na alkalickej redukcii Cu^{2+} iónov proteínom na Cu^+ a následnej chelatacii Cu^+ kyselinou bicinchonínovou za vzniku červeného sfarbenia.

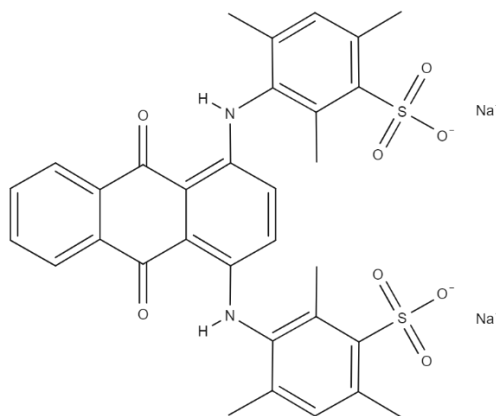


Obr. 39. Kyselina bicinchonínová.

Bicinchonínová metóda je značne variabilná. Jej citlivosť je závislá od doby a teploty inkubácie, od vlastností proteínu použitého na štandardizáciu a pod. Na reakciu medzi roztokom BCA a peptidovými väzbami v proteínoch je ideálna teplota 37°C . Pri izbovej teplote reaguje roztok BCA iba s tyrozínovými, treonínovými a cysteínovými aminokyselinovými zvyškami v proteínoch. Navyše, niektoré skupiny látok veľmi silno interferujú - napr. redukujúce sacharidy či amónne ióny. Pokiaľ sú však odstránené (napr. dialýzou), je metóda porovnateľná s Lowryho metódou.

Bradfordova metóda

Táto metóda je založená na tvorbe komplexu medzi proteínmi a trifenylmetanovým farbivom Coomassie Brilliant Blue G-250 (Obr. 40) v kyslom prostredí. K väzbe dochádza dvoma spôsobmi: trifenylmetánová skupina sa viaže na nepolárne oblasti proteínu a anión sulfoskupiny sa viaže na postranné reťazce aminokyselín nesúce kladný náboj (lyzín, arginín).



Obr. 40. Farbivo Coomassie brilliant blue G-250.

Po väzbe na proteín sa absorpčné maximum farbiva posúva zo 465 na 595 nm, dochádza teda k farebnej zmene, ktorá je úmerná množstvu proteínu. Reakcie je veľmi citlivá v prípade albumínu a ďalších globulárnych proteínov. Na rozdiel od Lowryho a BCA metódy je táto metóda kompatibilná s

redukujúcimi látkami používanými pre stabilizáciu proteínov v roztoku, avšak nie je ju možné použiť v prítomnosti detergentov narušujúcich tvorbu komplexu s proteínmi. Metóda je veľmi často používaná vďaka svojej jednoduchosti a citlivosti. Ako kalibračný proteín sa používa hovädzí sérový albumín. Metóda je zhruba tri až štyrikrát citlivejšia ako Lowryho a BCA metóda.

V biochemických laboratóriách sa môžeme stretnúť aj s ďalšími postupmi stanovenia proteínov. Napr. po kyslej hydrolyze možno proteíny stanoviť ninhydrínovou metódou. Proteíny obsahujúce vedľajšie reťazce tyrozínu a tryptofánu absorbujú svetlo v UV oblasti spektra pri 275 – 280 nm. Pri vhodnom zriedení vzorky proteínu je možné týmto spôsobom stanoviť celkové proteíny z UV absorbancie za použitia kviet z kremenného skla. V praktickej časti určíte koncentráciu proteínov v neznámej vzorke pomocou Lowryho metódy.

Úloha 8. Stanovenie proteínov Lowryho metódou

Pri reakcii proteínu s použitými činidlami (viď vyššie) dochádza k vzniku produktu, ktorý má modré sfarbenie. Jeho intenzita závisí od koncentrácie proteínu v roztoku. Množstvo proteínov vo vzorke sa určí na základe hodnoty nameranej absorbancie pri 750 nm.

Pomôcky: kadičky, stojan so skúmavkami, automatické pipety s nastaviteľným objemom, pipetovacie špičky (modré a žlté), vortex, sklenené tyčinky, analytické váhy, spektrofotometer Specord 50, plastové kvety

Materiál a chemikálie:

- vzorka s neznámou koncentráciou proteínov;
- fyziologický roztok (0,9 % NaCl);
- hovädzí sérový albumín alebo vaječný albumín s koncentráciou 50 mg/100 ml;
- roztok **A** 2 % Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH;
- roztok **B** 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ v 1 % tetrahydráte vínanu sodno-draselného;
- roztok **C**: roztoky A a B zmiešajte tesne pred laboratórnym cvičením v pomere 50:1;
- Folinovo činidlo (kyselina fosfomolybdeno-fosfovofrámová)

Pracovný postup: Do série označených skúmaviek pipetujte automatickou pipetou daný objem štandardného roztoku albumínu (Tabuľka 2) a neznámej vzorky. Doplňte destilovanou vodou na objem 1 ml. Pridajte 5 ml roztoku C a skúmavky dôkladne premiešajte na vortexe. Po 10 minútach pridajte 0,5 ml Folinovho činidla a opäť premiešajte. Po 30 minútach zmerajte absorbanciu pri 750 nm (postupujte podľa postupu, ktorý je uvedený v Úlohe 3).

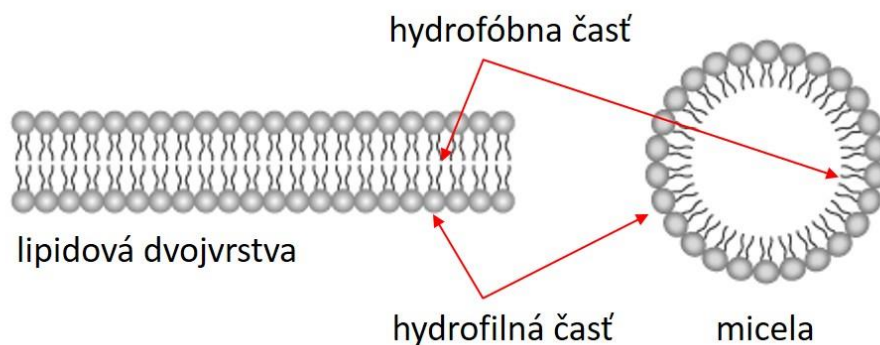
Tabuľka 2.

Skúmavka č.	1	2	3	4	5	6
Štandard albumínu (ml)	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	-
Neznáma vzorka (ml)	-	-	-	-	-	1
Destilovaná voda (ml)	0,95	0,90	0,75	0,50	0,25	-
Roztok C (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Skúmavky dôkladne premiešajte na vortexe a nechajte 10 minút reagovať						
Folinovo činidlo (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dôkladne premiešajte na vortexe, nechajte 30 minút stáť. Zmerajte absorbanciu pri 750 nm.						
Koncentrácia proteínu (mg/l)	25	50	125	250	375	x
Absorbancia pri 750 nm						

Vyhodnotenie výsledkov: Z nameraných hodnôt absorbaní štandardných roztokov albumínu zostrojte graf $A = f(c)$ (závislosť absorbanie štandardného roztoku albumínu pri 750 nm od koncentrácie albumínu) a použitím lineárnej regresie určite regresné koeficienty a , b a koeficient determinácie R^2 . Následne na základe nameraných absorbaní vzorky a rovnice kalibračnej priamky vypočítajte koncentráciu proteínov (mg/l) vo vzorke s neznámou koncentráciou.

4. Lipidy

Lipidy predstavujú veľmi rozmanitú skupinu látok, ktoré sú hydrofóbne (nerozpustné vo vode), ale dobre sa rozpúšťajú v nepolárnych organických rozpúšťadlách (chloroform, benzén, éter) – majú lipofilný charakter. Tým sa významne odlišujú od ostatných prírodných látok, ktoré sú zväčša hydrofilné a lipofóbne. Uvedená definícia dobre charakterizuje najmä jednoduché lipidy. Zložené lipidy obsahujú v molekule okrem základných zložiek ešte ďalšiu polárnu zložku, ktorá im dodáva amfifilný charakter – teda časť molekuly je hydrofóbna a časť hydrofilná. Takéto molekuly vo vodnom prostredí tvoria útvary, v ktorých je dotyková plocha nepolárnych častí a polárneho rozpúšťadla minimálna. Tieto útvary sú základom štruktúry biologických membrán (Obr. 41). Štruktúrne odlišnú skupinu tvoria izoprenoidné lipidy. Tieto majú hydrofóbne vlastnosti, podieľajú sa na transporte lipidov v organizme a spoločne tvoria súčasť biologických štruktúr.



Obr. 41. Lipidová dvojvrstva a micela.

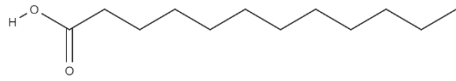
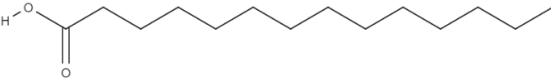
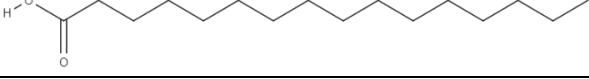
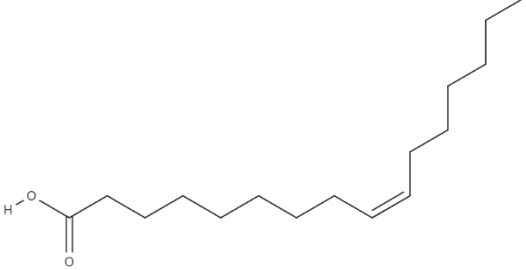
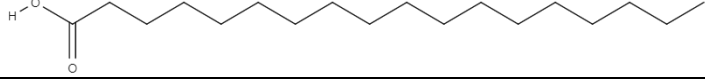
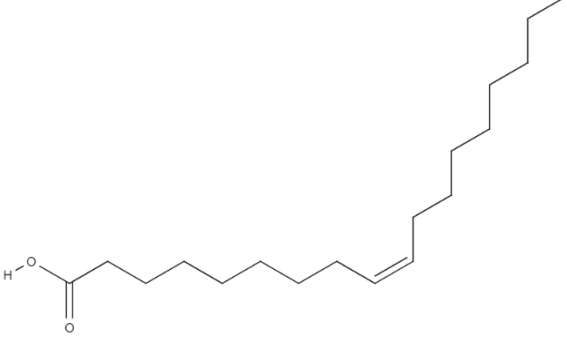
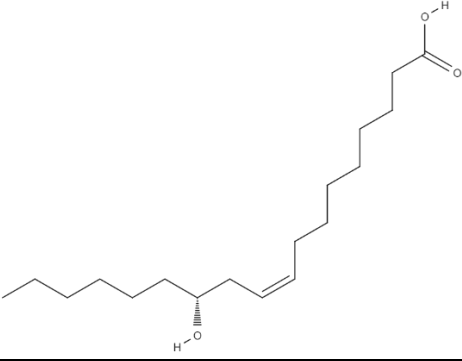
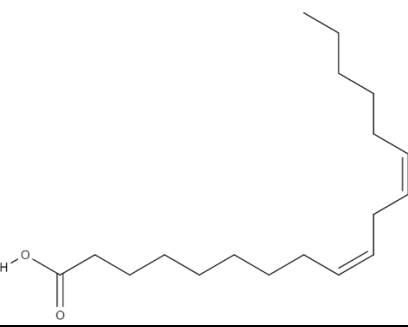
Medzi najdôležitejšie biologické funkcie lipidov v organizme patrí:

- **stavebná a štruktúrna**, lipidy sa spontánne orientujú do mono a dvojvrstiev a tým sa podieľajú na vzniku biomembrán (Obr. 41). Zúčastňujú sa tiež stavby nervových buniek a obaľujú nervové vlákna,
- **zdroj energie**, tuky a oleje sú najkoncentrovanejšou formou energie v potravinách a v potrave sú dôležité pre ich pomalé trávenie. Lipidy sú dôležitou zložkou potravy nielen pre svoj vysoký obsah energie, ale tiež preto, že poskytujú esenciálne mastné kyseliny a absorbujú a transportujú vitamíny rozpustné v tukoch,
- **ochranná funkcia**, časť acylglycerolov obaľuje niektoré orgány a chráni ich pred mechanickým poškodením. Podkožný tuk funguje ako izolačná bariéra zabraňujúca nadmernej strate tepla do okolia a tiež strate vody. Analogické funkcie plnia aj ochranné vrstvy voskov na listoch a plodoch rastlín, perí vtákov, srsti cicavcov.

Z chemického hľadiska sú lipidy estery vyšších karboxylových (mastných) kyselín. Podľa zloženia ich delíme na jednoduché a zložené. Karboxylové kyseliny v lipidoch majú párny počet uhlíkov a nerozvetvený reťazec. Môžu byť nasýtené alebo nenasýtené (Tab. 3). Základné delenie lipidov sumarizuje Obr. 42.

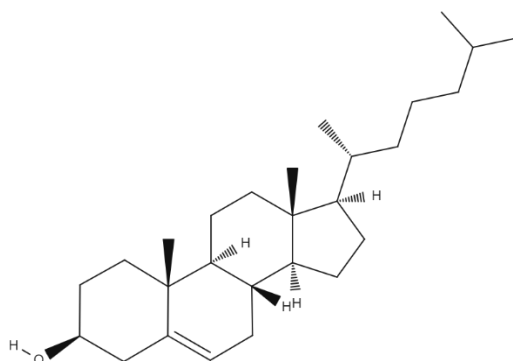
Jednoduché lipidy sú estery vyšších mastných kyselín a alkoholu. Podľa alkoholovej časti sa delia na acylglyceroly a vosky. Acylglyceroly (**tuky a oleje**) sú estery vyšších karboxylových kyselín, ktoré obsahujú trojsýtny alkohol glycerol. Ten môže mať esterifikovanú jednu, dve alebo tri hydroxylové skupiny. Podľa toho vznikajú mono-, di- alebo triacylglyceroly. Jednoduché lipidy, ktoré obsahujú prevažne nasýtené karboxylové kyseliny, sú za bežných podmienok tuhé - tuky. Ak obsahujú väčší podiel nenasýtených karboxylových kyselín, sú kvapalné a označujú sa ako oleje.

Tabuľka 3. Mastné kyseliny vyskytujúce sa v lipidoch.

Názov	Štruktúrny vzorec	Poznámka
laurová		C12, nasýtená
myristová		C14, nasýtená
palmitová		C16, nasýtená
palmitoolejová		C16, mono- nenasýtená, <i>cis</i> dvojitá väzba (9)
stearová		C18, nasýtená
olejová		C18, mono- nenasýtená, <i>cis</i> dvojitá väzba (9)
ricínolejová		C18, mono- nenasýtená, <i>cis</i> dvojitá väzba (9), obsahuje OH skupinu
linolová		C18, poly- nenasýtená, <i>cis</i> dvojitá väzba (9, 12), esenciálna

voskoch prevládajú alkoholy so 14 až 18 uhlíkovými atómami, v rastlinných alkoholy s dlhším reťazcom (26 – 30 uhlíkov).

Acysteroly obsahujú ako alkoholovú zložku cholesterol (Obr. 43) alebo iný sterol. Sú súčasťou lipidovej zložky biologických membrán a lipoproteínov, ktoré umožňujú regulovateľný transport lipidov v organizme. Hydrolytickým odštiepením mastnej kyseliny vzniká amfifilný steroidný alkohol. Táto lipofilno-amfifilná premena má význam v regulácii transportu lipidov.



Obr. 43. Cholesterol.

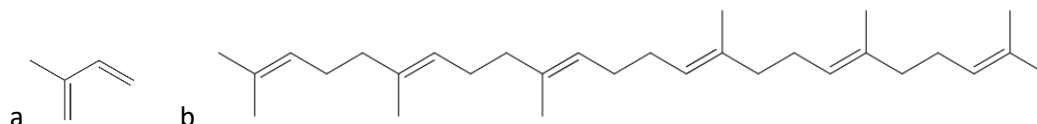
Zložené lipidy obsahujú vo svojej molekule okrem mastnej kyseliny a alkoholu ďalšiu zložku. **Fosfolipidy** obsahujú esterovo viazanú kyselinu fosforečnú a často obsahujú aj dusíkaté bázy a ďalšie substituenty. Delia sa na:

- glycerolfosfolipidy – v ktorých je alkoholová zložka glycerol. Majú význam predovšetkým ako zložky biomembrán (fosfatidylcholín sa nazýva lecitín, fosfatidyletanolamínu kefalín a bisfosfatidylglycerol je kardiolipín).
- sfingofosfolipidy – kde je alkohol sfingozín. Napr. sfingomyelíny sa vyskytujú v myelínovej pošve nervov.

Glykolipidy obsahujú sacharidovú zložku, napr. glukózu alebo galaktózu, masťnú kyselinu a sfingozín.

Lipoproteíny obsahujú bielkovinovú časť.

Izoprenoidy sú najväčšia a najpestrejšia skupina látok, ktorá je štruktúrne odvodená od molekuly izoprénu (2-metyl-1,3-butadién, Obr. 44a). Zaraďujeme sem terpény a steroidy. Podľa počtu izoprenoidných jednotiek rozlišujeme (1) hemi-, (2) mono-, (3) seskvi -, (4) di-, (6) tri-, (8) tetra- a polyterpény. Triterpén skvalén (Obr. 44b) je prekursor pri syntéze steroidov. Konečným produktom cykлизácie skvalénu je cholesterol (viď vyššie), ktorý je najdôležitejším živočíšnym sterolom. Ďalšími sterolmi sú lanosterol (z ovčej vlny), zymosterol a ergosterol (z kvasníc), sitosterol a stigmasterol (rastlinného pôvodu). K tetraterpénom patria napríklad karotény, xantofyly a iné lipofilné rastlinné farbivá.



Obr. 44. Izoprén (a) a triterpén skvalén (b).

Cholesterol (Obr. 43) patrí medzi najvýznamnejšie malé molekuly v biológii. Po prvýkrát bol cholesterol izolovaný v roku 1784 zo žlčových kameňov (názov pochádza z gréčtiny - *chole* = žlč a *stereos* = pevný).

Predstavuje životne dôležitú zložku bunkových membrán a je prekursorom mnohých steroidných hormónov a žlčových kyselín. Je najvýznamnejším živočíšnym steroidom. Polárna OH-skupina mu poskytuje slabý amfifilný charakter a kondenzované cykly zaručujú väčšiu pevnosť v porovnaní s ostatnými membránovými lipidmi. Syntéza cholesterolu zahŕňa niekoľko desiatok po sebe nasledujúcich enzymatických reakcií prebiehajúcich na membránach endoplazmatického retikula. Cholesterol je pre život nevyhnutný, hoci jeho ukladanie v tepnách je spájané s aterosklerózou a vznikom srdcového infarktu, a teda najčastejšími príčinami úmrtí človeka. V zdravom organizme je udržiavaná veľmi zložitá rovnováha medzi biosyntézou, využitím a transportom cholesterolu, ktorá udržuje jeho škodlivé ukladanie v minimálnych medziach.

Fluidita membrány je ovplyvnená najmä pomerom nasýtených a nenasýtených reťazcov fosfolipidov a obsahom cholesterolu. Vyššie zastúpenie nenasýtených uhľovodíkových reťazcov za fyziologických podmienok spôsobuje zvýšenú fluiditu membrán. Cholesterol pri vyšších teplotách znižuje fluiditu membrány, pravdepodobne interakciou s uhľovodíkovými reťazcami fosfolipidov a glykolipidov. Pri nízkych teplotách zabraňuje "stuhnutiu" membrány. Cholesterol teda zabezpečuje zachovanie konštantnej fluidity membrán.

Cholesterol je **prekursorom** pri biosyntéze veľkého počtu **biologicky aktívnych látok** - steroidných hormónov. Do tejto skupiny patria ženské pohlavné hormóny - estrogény (progesterón, estradiol), mužské pohlavné hormóny - androgény (testosterón), glukokortikoidy (kortizol) a mineralokortikoidy (aldosterón). Cholesterol je tiež prekursorom na syntézu vitamínu D. V organizme sa tiež premieňa na žlčové kyseliny. Tie sú syntetizované v pečeni a sekretované vo forme žlče, a sú esenciálne pre absorpciu tukov z tráviaceho traktu. V ľudskom tele sú dva zdroje cholesterolu – exogénny (z potravy) a endogénny (syntetizovaný pečňovými bunkami). Cholesterol je hydrofóbná molekula, ktorá v krvnom riečišti nie je voľne transportovaná. Novosyntetizovaný cholesterol je esterifikovaný na hydroxylovej skupine, pričom vznikajú estery cholesterolu. Na ich transporte v krvi vo forme lipoproteínových komplexov sa podieľajú lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou, ktoré sa postupne premieňajú na lipoproteíny s nízkou hustotou (LDL – low-density lipoproteins). Cholesterol, estery cholesterolu a triacylglyceroly z potravy sa v krvi prenášajú lipoproteínovými komplexami nazývanými chylomikróny. Po odstránení triacylglycerolov v periférnych tkanivách sa viažu na receptory pečňových buniek a do ich vnútra prenikajú pomocou receptorovej endocytózy. LDL teda prenášajú cholesterol z pečene k periférnym tkanivám. Naopak, transport cholesterolu z periférnych tkanív do pečene zabezpečujú lipoproteínové častice s vysokou hustotou (HDL – high-density lipoproteins). Nadbytočný cholesterol sa vylučuje vo forme žlčových kyselín. Zvýšená hladina **LDL** v krvi môže spôsobovať artériosklerózu. Cholesterol prenášaný týmito lipoproteínmi je preto označovaný ako "**zlý**", na druhej strane cholesterol transportovaný z periférie do pečene pomocou **HDL** častíc je označovaný ako "**dobry**".

Tabuľka 4. Hodnoty koncentrácie vybraných lipidov v krvi.

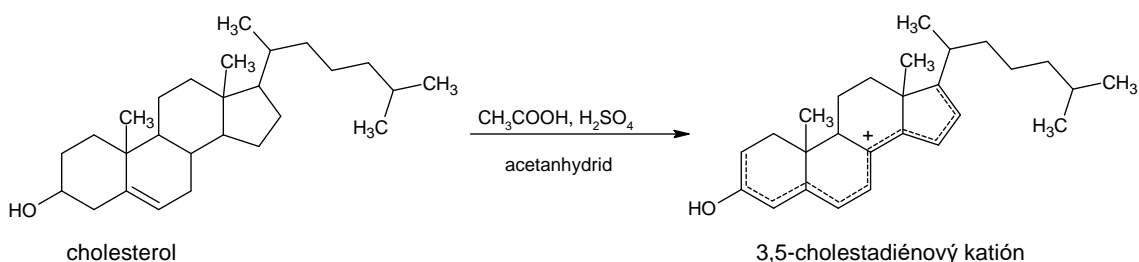
Lipid	typické hodnoty (mg/dl)	odporúčané hodnoty (mg/dl)
celkový cholesterol	170 - 210	< 200
LDL cholesterol	60 - 140	< 130
HDL cholesterol	35 - 85	> 40
Triacylglyceroly	40 - 150	< 135

Dôležitým ukazovateľom zdravia je aj koncentrácia cholesterolu a triacylglycerolov v krvi. Hodnoty týchto parametrov líšiace sa od normálu totiž poukazujú na nebezpečenstvo vzniku a rozvoja srdcovocievnych ochorení (Tab. 4). Na základe toho, čo už bolo spomenuté o "dobrom" a "zlom" cholesterolu

je zrejmé, že vysoké hodnoty LDL cholesterolu sú nebezpečné, kým vysoké hodnoty HDL cholesterolu sú dobré a želané.

Úloha 9. Stanovenie cholesterolu v olejoch

Na kvantitatívne stanovenie obsahu cholesterolu v oleji využijeme kolorimetrickú metódu založenú na Liebermann-Burchardovej reakcii, ktorá je špecifická pre nenasýtené steroidy a triterpény. V tejto reakcii reaguje cholesterol s kyselinou octovou, koncentrovanou kyselinou sírovou a anhydridom kyseliny octovej za vzniku zelených až zelenomodrých produktov, predovšetkým cholestapolyénov a cholestapolyénových karbóniových iónov (Obr. 45).



Obr. 45. Liebermann-Buchardova reakcia.

Pomôcky: sklenené pipety, automatické mikropipety, špičky, skúmavky, stojan na skúmavky, kadičky, analytické váhy, spektrofotometer

Materiál a chemikálie: kyselina octová ľadová, acetanhydrid, kyselina sírová, rybí olej, cholesterol (M(chol) 386,7 g/mol)

Pracovný postup: Pripravte si 50 ml zásobného roztoku cholesterolu s koncentráciou 20 mmol/l v ľadovej kyseline octovej (dobré sa rozpúšťa pri zahriatí). Pripravte sériu skúmaviek s koncentráciou cholesterolu 1, 2, 5, 10, 20 mmol/l tak, aby výsledný objem každého kalibračného roztoku bol 2 ml (Tab. 5). Do označených skúmaviek (1 – 5 a 1' – 5') pipetujte pomocou automatickej pipety 200 µl z príslušných kalibračných roztokov, pridajte 3 ml roztoku kyseliny octovej a acetanhydridu (1:5). Zmesi premiešajte a nechajte ich stáť po dobu 5 min pri laboratórnej teplote. Následne, tesne pred meraním, pridajte do každej skúmavky 0,6 ml 96 % kyseliny sírovej, opäť premiešajte a zmerajte na spektrofotometri absorbanciu jednotlivých roztokov proti blanku pri vlnovej dĺžke 575 nm (Tab. 6). Postupujte podľa postupu, ktorý je uvedený v Úlohe 3. Uskutočnite 2 paralelné merania (meranie je nutné dokončiť do 30 min od pridania kyseliny kvôli nízkej stabilite vznikajúceho komplexu). Rovnako postupujte aj pri stanovení obsahu cholesterolu v neznámych vzorkách a výsledky zaznačte do Tab. 7.

Tabuľka 5. Príprava štandardných roztokov.

Štandardný roztok č.	c (chol) [mmol/l]	V zásob. roztoku cholesterolu [ml]	V riediaceho roztoku (ľad. kys. octová) [ml]	výsledný V [ml]
1	1			2
2	2			2
3	5			2
4	10			2
5	20			2

Tabuľka 6. Namerané hodnoty absorbancií štandardných roztokov.

skúmavka	1	1'	2	2'	3	3'	4	4'	5	5'
c (chol) [mmol/l]	1		2		5		10		20	
A 575 nm										

Vyhodnotenie výsledkov: Z nameraných hodnôt absorbancií štandardných roztokov cholesterolu zostrojíte graf $A = f(c)$ (závislosť absorbancie štandardného roztoku cholesterolu pri 575 nm od koncentrácie cholesterolu) a použitím lineárnej regresie určíte regresné koeficienty a , b a koeficient determinácie R^2 . Následne na základe nameraných absorbancií vzorky a rovnice kalibračnej priamky vypočítajte koncentráciu cholesterolu (mmol/l) vo vzorke s neznámou koncentráciou.

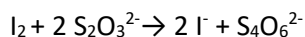
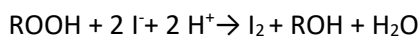
Tabuľka 7. Namerané hodnoty absorbancií neznámych vzoriek.

Vzorka	V1	V1'	V2	V2'
A 575 nm				
c (chol) [mmol/l]				

V1 – rybí olej, V2 – rybí olej 2

Úloha 10. Stanovenie peroxidového čísla tukov a olejov

Tuchnutie tukov predstavuje súhrn chemických zmien, ktoré vedú k zhoršeniu organoleptických vlastností. Ide predovšetkým o oxidačné hydrolytické reakcie charakterizované vznikom hydroperoxidov. Obsah peroxidov a hydroperoxidov sa stanovuje pomocou peroxidového čísla. Uvedené oxidačné produkty reagujú s nasýteným roztokom jodidu draselného za vzniku jódu, ktorý sa titruje štandardizovaným roztokom tiosíranu sodného. Peroxidové číslo udáva množstvo aktívneho kyslíka na 1 kilogram tuku. Metóda je použiteľná pre všetky živočíšne a rastlinné tuky a oleje, masťné kyseliny vrátane ich zmesí s peroxidovým číslom do 30 meq aktívneho kyslíka v kg vzorky. Metóda nie je vhodná pre mliečne tuky a nemožno ju použiť na lecitíny. Jodometrické stanovenie peroxidového čísla prebieha na základe reakcií:



Uvoľnený jód je možné stanoviť aj elektrochemickými metódami. Kolorimetrické stanovenie peroxidového čísla je založené na oxidácii železnatých iónov na železité ióny, ktoré sa stanovujú ako farebný tiokyanatan železitý.

Pomôcky: banky so zátkami, odmerný valec, pipeta, byreta, mikroténové fólie, váhy

Chemikálie: 50 % roztok jodidu draselného, roztok tiosíranu sodného (0,001 mol/l), kyselina octová, chloroform, destilovaná voda, vzorka tuku a oleja

Pracovný postup: Do Erlenmayerovej banky so zábrusom odvážite 1 g vzorky tuku alebo oleja s presnosťou na 1 mg. Do banky pridajte 10 ml chloroformu, banku ihneď uzavrite a tuk pretrepaním rozpustite. K roztoku pridajte 10 ml koncentrovanej kyseliny octovej, zmes premiešajte a následne pridajte 1 ml roztoku jodidu draselného. Dajte pozor, aby nevznikali

pary. Banku zazátkujte, zmes v nej asi 1 minútu pretrepávajte a následne uložte na tmavé miesto. Po 5 minútach do banky pridajte 75 ml destilovanej vody a za intenzívneho pretrepávania titrujte roztok uvoľneného jódu odmerným roztokom tiosíranu sodného. Priebeh reakcie indikuje červenofialové zafarbenie jódu rozpusteného v chloroforme. Vždy po pretrepaní reakčnej zmesi počkajte, kým dôjde k rozdeleniu vrstiev. Titrujte až do odfarbenia chloroformovej vrstvy. Spotrebu tiosíranu označte V_1 . Toto stanovenie sa vykoná pri každej vzorke dvakrát.

Prevedte slepý pokus. Postupujte pri ňom rovnako, ale bez použitia vzorky tuku. Spotrebu zaznamenajte ako V_2 .

Roztok KI musí byť bezfarebný alebo iba veľmi slabo sfarbený do žltá. Spotreba roztoku tiosíranu sodného v prípade slepej vzorky nesmie prekročiť 1 ml.

Vyhodnotenie: Peroxidové číslo (PV), vyjadrené v miliekvivalentoch aktívneho kyslíka na kilogram, vypočítajte podľa vzorca:

$$PV = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

kde:

V = objem (v ml) roztoku tiosíranu sodného korigovaný výsledkom slepého pokusu;

T = molarita použitého roztoku tiosíranu sodného;

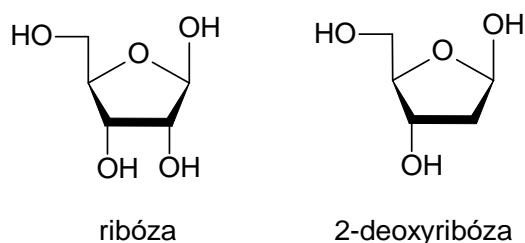
m = hmotnosť navážky vzorky (v g).

Zhodnoťte zistené výsledky vo vzťahu ku kvalite testovaných vzoriek.

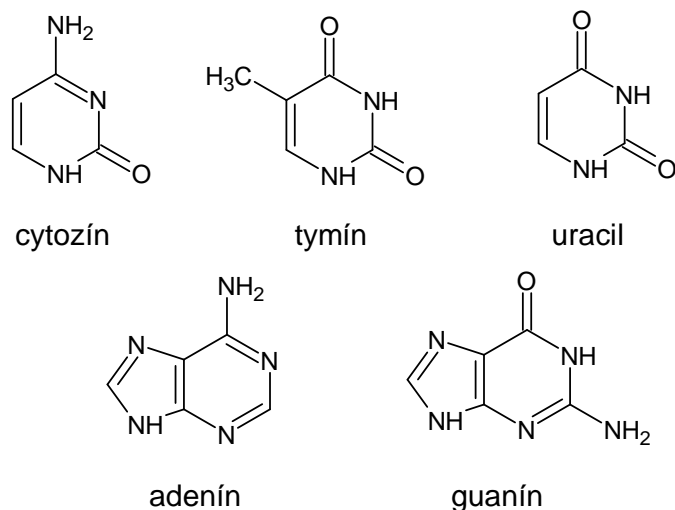
5. Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny objavil v roku 1869 švajčiarsky lekár a biológ Friedrich Miescher. Z bunkového jadra izoloval kyslú látku s vysokým obsahom fosforu rozpustnú v hydroxidoch a podľa miesta výskytu ju nazval nukleín. V hierarchii látok potrebných na existenciu živej hmoty stoja nukleové kyseliny najvyššie.

Nukleové kyseliny sú makromolekulové látky, ktoré vo svojej štruktúre nesú genetickú informáciu. Podľa sacharidovej zložky nukleotidov rozlišujeme kyselinu deoxyribonukleovú (DNA) – obsahuje sacharid 2-deoxyribózu, a kyselinu ribonukleovú (RNA), ktorá obsahuje sacharid ribózu. Základnou stavebnou jednotkou nukleových kyselín je nukleotid. Nukleotid je tvorený heterocyklickou bázou, ktorá N-glykozidickou väzbou viaže sacharid (ribóza alebo 2-deoxyribóza, Obr. 46) a esterovou väzbou zvyšok kyseliny trihydrogenfosforečnej (fosfát). Heterocyklické bázy v nukleových kyselinách sú odvodené od purínu alebo pyrimidínu. Najčastejšie zastúpené pyrimidínové bázy sú cytozín (C), tymín (T) a uracil (U) a purínové bázy adenín (A) a guanín (G) (Obr. 47).



Obr. 46. Pentózy ribóza a 2-deoxyribóza.

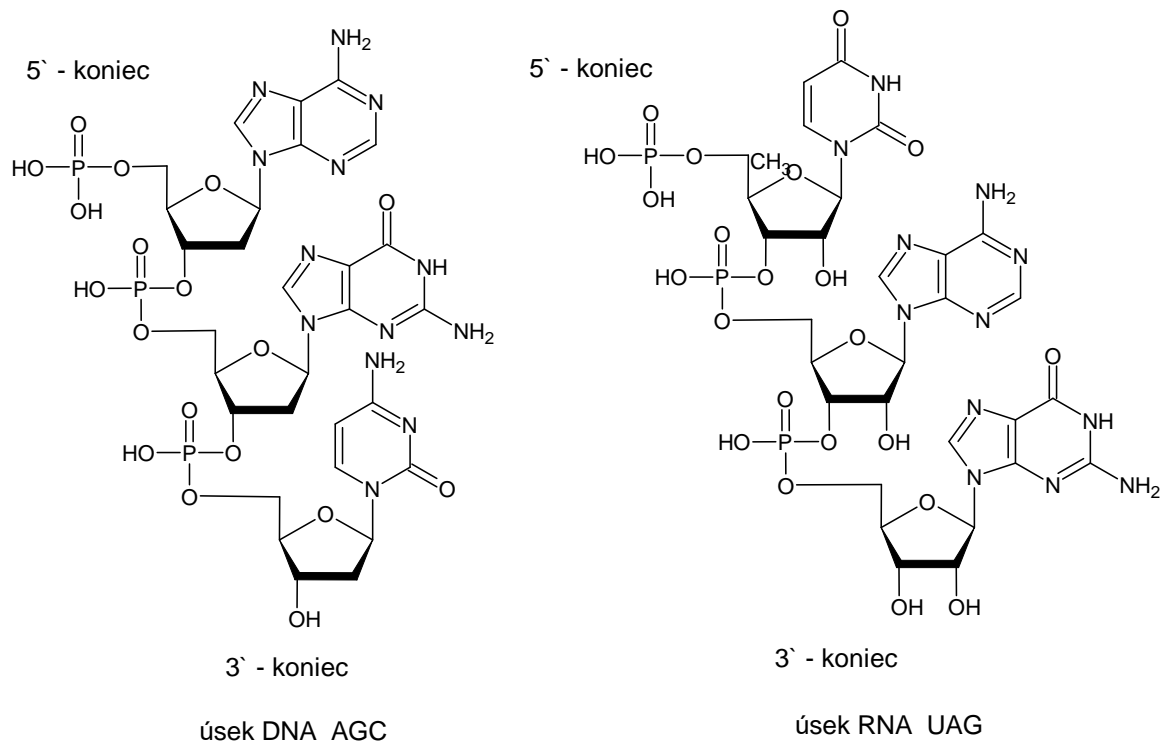


Obr. 47. Pyrimidínové a purínové bázy.

Molekula DNA obsahuje štyri zásady – adenín, guanín, cytozín a tymín, v prípade RNA je tymín nahradený uracilom. Prítomné môžu byť aj iné bázy, tzv. minoritné (5-metylcytozín, pseudouridín...). Jednotlivé nukleotidy sú viazané do polynukleotidového reťazca prostredníctvom fosfátu, pričom vzniká diesterová väzba (Obr. 48).

Okrem primárnej štruktúry reprezentovanej poradím báz v polynukleotidovom reťazci je molekula DNA charakterizovaná ešte sekundárnou a terciárnou štruktúrou. Objav sekundárnej štruktúry DNA

patrí asi k najvýznamnejším objavom v 20. storočí. V roku 1953 Watson a Crick s využitím poznatkov Franklinovej (RTG difrakčná analýza DNA) zistili, že molekula DNA má tvar dvojitého helixu, ktorý je zložený z dvoch antiparalelných polynukleotidových reťazcov. Reťazce sú sformované tak, že kostra pozostáva z pentózových kruhov a zvyškov kyseliny fosforečnej, a do vnútra dvojitého helixu smerujú bázy. Takáto štruktúra je stabilizovaná vodíkovými väzbami medzi bázami vyskytujúcimi sa v dvoch reťazcoch. Podľa Chargaffových pravidiel sa adenín páruje s tymínom dvomi vodíkovými väzbami a cytozín s guanínom tromi vodíkovými väzbami.



Obr. 48. Primárna štruktúra DNA a RNA.

Experimentálne bolo preukázané, že DNA je nositeľom genetickej informácie, teda základom dedičnosti. V DNA je uložená základná genetická informácia potrebná na biosyntézu proteínov. Táto informácia je zapísaná (zakódovaná) formou poradia jednotlivých nukleotidov (genetický kód). Informácia sa môže prenášať na ďalšie generácie v procese replikácie DNA (pri rozdelení bunky) alebo nastáva prepis z DNA na mediátorovú RNA (transkripcia) na základe komplementárneho párovania báz. Mediátorová RNA sa bezprostredne zúčastňuje biosyntézy proteínov (translácia). Prenos informácie po osi DNA → RNA → proteín je podstatou centrálnej dogmy molekulovej biológie. Celkovo rozoznávame päť základných typov RNA, ktoré sa líšia predovšetkým funkciou, lokalizáciou a relatívnou molekulovou hmotnosťou: a) mediátorová (messengerová) – mRNA; b) ribozómová – rRNA; c) transferová – tRNA; d) malé jadrové – snRNA; e) vírusová RNA.

Lokalizácia DNA v bunkách. V **prokaryotických** bunkách sa DNA vyskytuje v cytoplazme a okrem chromozomálnej kruhovej DNA môžu bunky baktérií obsahovať aj cirkulárnu extrachromozomálnu DNA – plazmidy. Plazmidy sú bunke prítomné v jednej alebo viacerých kópiách a dokážu sa replikovať nezávisle od bakteriálneho chromozómu. Oba typy bakteriálnej DNA majú štruktúru kruhovej dvojzávitnice a navzájom sa líšia veľkosťou. V **eukaryotických** bunkách živočíchov sa DNA vyskytuje v jadre, ktoré je od zvyšku cytoplazmy oddelené jadrovou membránou, a v mitochondriách. Chromozomálna DNA je lineárna a mitochondriálna DNA, podobne ako plazmidová, predstavuje kruhové, dvojláknové molekuly DNA, ktoré existujú a replikujú sa nezávisle od štruktúry chromozómu.

Rastlinné eukaryotické bunky obsahujú okrem jadrovej a mitochondriálnej DNA aj plastidovú (chloroplastovú), ktorá má podobné vlastnosti ako DNA mitochondrií. Z dôvodu rozdielnej veľkosti a lokalizácie jednotlivých typov DNA v bunke, ako aj rozdielnej stavby jednotlivých typov buniek, sa jednotlivé typy DNA izolujú rôznymi spôsobmi. Vďaka týmto rozdielom je možné jednotlivé typy DNA od seba izolovať.

Metódy izolácie nukleových kyselín. Na izoláciu nukleových kyselín zo živých organizmov bolo vyvinutých mnoho metód, ktoré sa od seba môžu značne líšiť. V princípe je vždy prvým krokom lýza buniek alebo pevných tkanív. V prípade buniek väčšinou postačuje rozrušenie bunkovej steny a membrány. Na tento účel sa využívajú najmä detergenty typu SDS (dodecylsulfát sodný) alebo Triton X-100. Pri izolácii DNA alebo RNA z rastlinných pletív alebo živočíšnych tkanív je potrebné ich najskôr mechanicky narušiť buď mrazom (tekutý dusík) alebo homogenizátormi. Bunkový obsah vrátane DNA sa z lyzovaných buniek uvoľní do extrakčného pufru. Takéto pufré obsahujú vždy chelatačné činidlo EDTA, ktoré vychytá všetky vápenaté a horečnaté ióny z extraktu. Dôvodom je fakt, že Ca^{2+} ióny fungujú ako kofaktory nukleáz – enzýmov, ktoré štiepia nukleové kyseliny, a aktívne nukleázy by počas extrakcie štiepili všetky izolované nukleové kyseliny. Súčasťou extrakčného pufru sú niekedy aj proteínázy, enzýmy štiepiace proteíny. Väčšina DNA je asociovaná s bázickými proteínmi – histónmi (podieľajú sa na stavbe chromatinu) a ich odstránenie proteínázami zvýši čistotu izolovanej DNA.

Časť metód izolácie nukleových kyselín je založená na extrakcii zmesou fenolu a chloroformu. Fenol sa rozpúšťa vo vode i v chloroforme, preferuje ale chloroform. Chloroform ako nepolárne organické rozpúšťadlo sa s vodou nemieša. Ak pridáme zmes fenolu a chloroformu k extraktu zo živých tkanív, všetky tuky prechádzajú do chloroformu, proteíny a časť polysacharidov sa pôsobením organických rozpúšťadiel vyzráža a nukleové kyseliny zostanú vo vodnej fáze. Po extrakcii sa zmes odstredí a vzniknuté fázy sa od seba oddelia. Vyzrážané proteíny a sacharidy vytvoria na rozhraní bielu kruhovú zrazeninu. Nukleové kyseliny sa z vodnej fázy vyzrážajú absolútnym etanolom s prídavkom soli alebo izopropanolom. Opaleskujúci pelet nukleových kyselín vznikajúci po intenzívnej centrifugácii (14.000 rpm) sa premýva etanolom, suší a následne rozpúšťa vo vode alebo vhodnom pufri.

Novšie metódy izolácie využívajú adsorpciu nukleových kyselín na silikát v prítomnosti chaotropných solí, napr. guanidín izotiokyanát. Chaotropné soli sú soli chaotropných činidiel (ako sú napr. močovina a guanidínhydrochlorid), ktoré rozrušujú vodíkové mostíky vody tým, že s vodou tieto mostíky sami vytvárajú. Vo vysokých koncentráciách (6 – 9 mol/l) pôsobia ako denaturačné činidlá, pretože rušia hydrofóbne interakcie. Extrakt nukleových kyselín sa zmieša so silikátovou maticou v podobe vrstvy silikátových guličiek v prítomnosti chaotropnej soli. Nukleové kyseliny sa naviažu na guličky a tie sa potom premývaním zbavia kontaminujúcich proteínov, polysacharidov a iných nečistôt. Nukleové kyseliny z guličiek sa uvoľnia znížením iónovej sily roztoku. Táto metóda je veľmi rýchla a efektívna a využíva sa vo väčšine komerčných setov pre izoláciu nukleových kyselín, napr. v diagnostických laboratóriách.

Úloha 11. Izolácia genómovej DNA z ovocia

Nasledovný experiment je realizovateľný aj v domácich podmienkach, čomu je prispôbený aj použitý materiál a pomôcky. Ako zdroj DNA rastlinného pôvodu použijete zmrazené jahody. Bunkový povrch jednotlivých buniek jahôd sa rozruší vznikajúcimi kryštálkami ľadu počas ich rozmrazovania. Ako zdroj enzýmov na uvoľnenie DNA z proteínov viažucich DNA do podoby chromozómov (histónové proteíny) bude slúžiť čerstvá ananásová šťava, ktorá obsahuje veľké množstvo proteázy bromelaín. Zvyšky buniek od DNA oddelíte filtráciou cez sitko. Destilát s vysokým obsahom alkoholu spôsobí vyzrážanie DNA vo forme zrazeniny pripomínajúcej vatú, ktorá je dobre viditeľná aj voľným okom.

Pomôcky: odšťavovač alebo strúhadlo, drevená špajdľa, sklené nádoby, jemné kuchynské sitko

Materiál: zamrzené jahody, čerstvý ananás, destilát s vysokým obsahom alkoholu

Pracovný postup: Rozmrazte jahody (4 – 5 ks). Odšťavte ananás s použitím odšťavovača alebo jemného strúhadla. Do vhodnej nádoby vložte rozmrzené jahody a pridajte približne 100 ml ananásovej šťavy. V ananásovej šťave jahody dôkladne roztlačte a nechajte stáť pri izbovej teplote aspoň 30 minút. Získanú hmotu následne precedte cez jemné sitko. Získanú ovocnú šťavu opatrne prevrstvite 50 ml ľadovo vychladeného vysokoperceného alkoholu. Po pár minútach namotajte biele chumáče izolovanej hmoty – DNA na drevenú špajdľu.

Úloha 12. Izolácia RNA z kvasníc

Vhodným materiálom pre izoláciu RNA sú pekárske kvasnice, ktoré obsahujú približne 4 % RNA. Kvasinky sú jednobunkové eukaryotické organizmy, ktoré majú na povrchu bunkovú stenu. Po jej rozrušení trením s malým množstvom morského piesku v trecej miske sa RNA extrahuje 0,5 % roztokom NaOH a po úprave pH sa zráža ľadovým etanolom.

Pomôcky: trečia miska, kadičky, odmerné banky, centrifugačné skúmavky, centrifúga, indikátorové papieriky, filtračný papier, analytické váhy

Materiál a chemikálie: kyselina octová (5 a 50 %), 0,5 % hydroxid sodný, dietyléter, pekárske droždie

Pracovný postup: Zmes 40 g kvasníc (pekárskeho droždia), 3 ml destilovanej vody a 3 ml dietyléteri rozotrite s použitím morského piesku v trecej miske. Do pripraveného homogenátu pridajte postupne 50 ml vychladeného 0,5 % NaOH a pokračujte v roztieraní aspoň 15 min. Následne upravte pH homogenátu s použitím 5 % kyseliny octovej na hodnotu pH 6. Zmes centrifugujte pri 3000 rpm počas 10 min. (pozri časť 1.4, centrifugačné skúmavky musia byť dôkladne vyvážené). Supernatant zlejte do kadičky a s 50 % kyselinou octovou upravte pH na 3,5 (zaznamenajte použitý objem kyseliny octovej). Následne pridajte rovnaký objem vychladeného etanolu. Vzniknutá zrazenina predstavuje ribonukleoproteín, ktorý po centrifugácii (10 min, 3000 rpm) použijete v ďalšom experimente na stanovenie spektrofotometrickej čistoty izolovanej RNA a pri dôkaze zložiek RNA.

Úloha 13. Izolácia DNA zo sleziny

DNA je v bunke viazaná s bázickými proteínmi – histónmi, vo forme deoxyribonukleoproteínu (DNP). Pri jeho izolácii sa vychádza z tkanív obsahujúcich bunky s veľkými jadrami (napr. slezina). Na extrakciu sa používa roztok chloridu sodného. Po zriedení roztoku sa vylúči deoxyribonukleoproteín vo forme vláknitého produktu. Pri extrakcii zriedeným roztokom môže dochádzať k depolymerizácii vplyvom aktivity nukleáz.

Pomôcky: trečia miska, kadičky, odmerný valec, centrifugačné skúmavky, centrifúga, filtračný papier, drevená špajdľa, analytické váhy

Materiál a chemikálie: 1 M chlorid sodný, čerstvá slezina

Pracovný postup: 5 g skalpelom nakrájanej sleziny rozotrite s trochou morského piesku v trecej miske. Za intenzívneho roztierania po malých dávkach pridávajte celkovo 100 ml 1M NaCl a

homogenizujte 15 min. Viskozita roztoku stúpa postupom extrakcie DNA. Pripravený homogenát centrifugujte 10 min pri 4000 rpm (centrifugačné skúmavky musia byť dôkladne vyvážené), supernatant zlejte a pomaly prilievajte do šesťnásobného množstva vychladenej destilovanej vody. DNA sa zráža vo forme vlákna, ktoré sa navíja na drevenú špajdlu. Tieto vlákna preneste do dvoch skúmaviek a následne použite v ďalších úlohách.

Úloha 14. Dôkaz zložiek DNA a RNA

2-deoxypentózy, podobne ako väčšina ostatných monosacharidov, poskytujú zahrievaním v kyslom prostredí deriváty furalu (viď úloha 4) a niektoré ďalšie chromogénne látky, ktoré dávajú s aromatickými amínmi charakteristické sfarbenie. DNA a RNA možno rozlíšiť na základe farebných reakcií, ktoré poskytujú ribóza a 2-deoxyribóza s difenylamínom. Difenylamín poskytuje s RNA zelené a s DNA modré sfarbenie.

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, automatické pipety, špičky, kadičky, elektrický varič

Materiál a chemikálie: izolovaná DNA a RNA z predchádzajúcich úloh (12, 13), difenylamínová reagentia (do 100 ml 1 % roztoku difenylamínu v ľadovej kyseline octovej sa pridá 2,75 ml koncentrovanej kyseliny sírovej), 0,5 % hydroxid sodný

Pracovný postup: Do skúmaviek preniesieme prvú časť izolovanej DNA a RNA, pridajte 1 ml 0,5 % NaOH a následne po premiešaní a rozpustení pridajte 1 ml difenylamínovej reagentie. Zahrievajte 10 – 20 min vo vriacom vodnom kúpeli. Pozorujte vývoj sfarbenia.

Vyhodnotenie: Ako sa líši DNA a RNA? Vysvetlite vznik modrého sfarbenia.

Úloha 15. Spektrofotometrické stanovenie nukleových kyselín

Prítomnosť purínových a pyrimidínových dusíkatých zásad v polynukleotidovom reťazci, ktoré vďaka aromatickému charakteru absorbujú svetlo v UV oblasti, umožňuje spektrofotometrom merať absorbanciu roztoku s izolovanou DNA i RNA. Týmto postupom je možné získať pomerne presnú informáciu o množstve izolovanej DNA či prípadnom znečistení RNA.

Pre **spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA** sa meria absorbancia roztoku DNA pri 260 nm. Súčasne sa zmeria absorbancia aj pri vlnovej dĺžke 320 nm, pri ktorej nukleové kyseliny a proteíny žiarenie neabsorbujú. Prítomná absorbancia pri tejto vlnovej dĺžke indikuje obsah ďalších látok v roztoku. Absorbancia s hodnotou 1 pri 260 nm zodpovedá koncentrácii dvojitáknovej DNA 50 µg/ml, jednovláknovej DNA 40 µg/ml, RNA 40 µg/ml a oligonukleotidov 20 µg/ml. Koncentráciu DNA určíme zo vzťahu:

$$\text{koncentrácia } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} - A_{320}) \times \text{zriedenie vzorky} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Hodnota absorbancie však závisí nielen od množstva DNA, ale aj od množstva sekundárnych štruktúr prítomných v DNA. Absorpčné maximum roztoku RNA je 260 nm a minimum pri 230 nm.

Spektrofotometrické stanovenie čistoty nukleových kyselín. Molekuly nukleových kyselín sú najčastejšie znečistené proteínmi, ktoré majú absorpčné maximum pri 280 nm. Pomer absorbancií pri 260 nm a 280 nm udáva čistotu nukleových kyselín. Ak je pomer A_{260}/A_{280} 1,8, indikuje to dostatočne čistú DNA. Pomer A_{260}/A_{280} 2,0 naznačuje dostatočne čistú RNA. Hodnota

nižšia ako 1,8 poukazuje na prítomnosť proteínov (aromatické aminokyseliny fenylalanín, tyrozín a tryptofán), fenolu alebo iných znečisťujúcich látok s absorpčným maximom v oblasti 280 nm. V prípade molekúl RNA izolovaných z rôznych tkanív a rôznymi izolačnými metódami sa pomer A_{260}/A_{280} pohybuje v rozmedzí 1,7 – 2. Hodnota nižšia ako 1,7 je znakom kontaminácie RNA proteínmi. Takáto vzorka má tendenciu sa rýchlo rozkladať vďaka pravdepodobnej prítomnosti ribonukleáz.

Pretože preparáty izolované v predchádzajúcich úlohách obsahujú okrem nukleových kyselín aj značný podiel proteínov, ktoré absorbujú pri 280 nm, použijeme na stanovenie obsahu nukleových kyselín pomer absorbancií A_{280}/A_{260} podľa metódy Warburga a Christiana (Tabuľka 8).

Tabuľka 8. Hodnoty faktoru F podľa Warburga a Christiana.

A_{280}/A_{260}	% nukleových kyselín	F
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, automatické pipety, špičky, spektrofotometer, kremenné kyvety

Materiál a chemikálie: izolovaná DNA a RNA z predchádzajúcich úloh (12, 13), 0,5 % hydroxid sodný

Pracovný postup: K zvýšenému podielu izolovanej DNA a RNA pridajte 0,5 ml 0,5 % NaOH. Do kremennej kyvety (10 mm) napipetujte 2 ml 0,5 % NaOH a pridajte 20 μ l DNA alebo RNA v roztoku NaOH. Následne zmerajte absorpčné spektrum v rozsahu 200 – 350 nm (postupujte podľa návodu v Úlohe 2). Plastové a sklenené kyvety sú pre tento účel nevhodné z dôvodu

absorbencie UV žiarenia. Ako slepý pokus (blank) použijete 0,5 % NaOH. Zo spektra odčítajte hodnoty absorbancie pri 260 a 280 nm.

Vyhodnotenie: Metódou Wartburga a Christiana zistíte podiel nukleových kyselín a obsah proteínov v izolovaných preparátoch. Pri výpočte balastných proteínov nachádzajúcich sa vo vzorke použijete nasledovný vzťah:

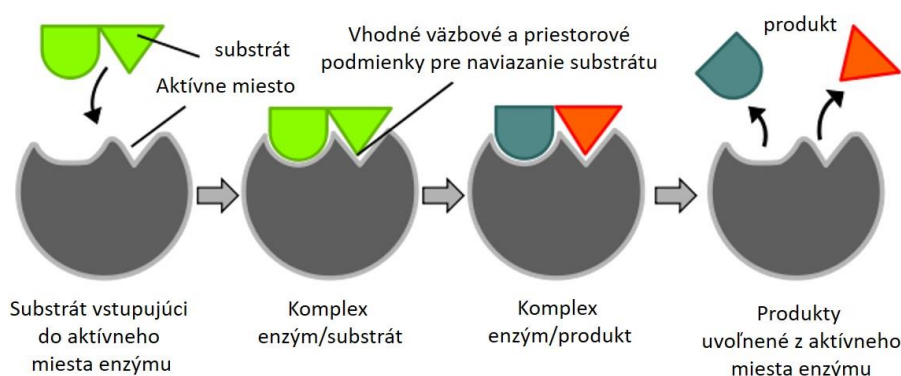
$$\text{proteíny (mg/ml)} = F \cdot A_{280} / d$$

kde d je optická dráha kyvety vyjadrená v cm a F je faktor z Tabuľky 8.

Na základe zistených hodnôt absorbancie určíte koncentráciu DNA v roztoku.

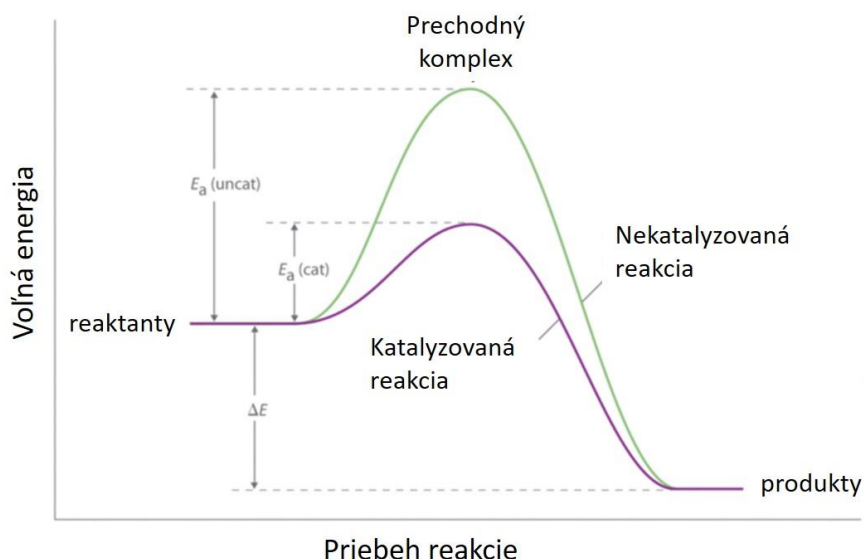
6. Enzýmy

Enzýmy sú látky bielkovinovej povahy, ktoré majú funkciu biokatalyzátorov, teda urýchľujú priebeh biochemických reakcií. Bez enzýmov by väčšina metabolických reakcií v podmienkach biologických systémov (vodné prostredie, teplota, tlak) neprebiehala, prípadne prebiehala veľmi pomaly. Nakoľko sú enzýmy proteíny, vyznačujú sa špecifickou štruktúrou. Môžu byť jednoduché, alebo môžu obsahovať aj neproteínovú zložku. Proteínovú časť nazývame **apoenzým** a nízkomolekulovú neproteínovú zložku **kofaktor**. Kofaktorom môžu byť niektoré katióny kovov, napr. Zn^{2+} , Mg^{2+} , alebo organické molekuly nazývané **koenzýmy** (FAD, NAD a iné). Enzýmy sa chemicky viažu so substrátmi (zlúčeniny vstupujúce do reakcie) za vzniku prechodného, nestáleho komplexu enzým-substrát. Prechodný komplex sa veľmi rýchlo rozpadá za uvoľnenia produktu (produktov) biochemickej reakcie (Obr. 49).



Obr. 49. Katalytické pôsobenie enzýmov.

Podstatou účinku katalyzátora je zníženie aktivačnej energie (E_a), ktorú molekuly reagujúcich látok potrebujú na uskutočnenie reakcie. Na Obr. 50 je porovnanie priebehu enzýmom katalyzovanej reakcie a nekatalyzovanej reakcie.



Obr. 50. Porovnanie priebehu enzýmom katalyzovanej reakcie a nekatalyzovanej reakcie.

Katalytické účinky si enzýmy zachovávajú aj po uvoľnení z buniek. V určitom prostredí a pri určitých podmienkach (*in vitro*) môžu enzýmy katalyzovať rovnaké chemické reakcie ako v živých organizmoch. Základný rozdiel medzi enzýmami a ostatnými katalyzátormi je v tom, že svojou špecifickou štruktúrou chemické reakcie nielen urýchľujú, ale aj regulujú, a chemických reakcií sa priamo zúčastňujú.

So substrátom nereaguje celý povrch enzýmu, ale substrát sa viaže len na špecifické miesto povrchu. Toto miesto sa označuje ako **aktívne miesto** (Obr. 49) a vytvára vhodné väzbové a priestorové podmienky na naviazanie substrátu. Molekula substrátu sa viaže na aktívne miesto enzýmu tak, že jej určité charakteristické skupiny sú priťahované medzimolekulovými interakciami aminokyselín aktívneho centra. Tvorba komplexu enzým-substrát sa teda realizuje stechiometrickou väzbou molekuly substrátu na aktívne miesto enzýmu. V aktívnom mieste enzýmu možno rozlíšiť väzbové a katalytické miesto.

Enzýmy sa vyznačujú **špecifickosťou účinku**, teda schopnosťou katalyzovať len jednu z termodynamicky možných premien substrátu. Špecifickosť účinku je ovplyvňovaná koenzýmom. **Substrátová špecifickosť** označuje schopnosť určitého enzýmu katalyzovať premenu len určitého substrátu (úzka špecifickosť) alebo skupiny substrátov (širšia špecifickosť). Za substrátovú špecifickosť zodpovedá apoenzým, konkrétne aktívne miesto.

Katalytická aktivita enzýmu je schopnosť enzýmu urýchliť určitú reakciu - teda premieňať substrát na produkt v závislosti od času. Jednotkou katalytickej aktivity je katal (kat), čo je enzýmová aktivita, ktorá premení 1 mol substrátu za 1 sekundu pri optimálnom pH a nasýtení substrátom. Špecifická aktivita enzýmu je počet katalov vzťahnutý na 1 kg proteínu. Enzýmová aktivita je ovplyvňovaná fyzikálno-chemickými podmienkami prostredia. Významný vplyv na enzýmovú aktivitu má:

- koncentrácia substrátu,
- teplota,
- pH,
- iónová sila,
- oxidačno-redukčný potenciál,
- prítomnosť aktivátorov,
- prítomnosť inhibítorov.

Rýchlosť enzýmovej reakcie stúpa so stúpajúcou koncentráciou substrátu dovtedy, kým nedôjde k obsadeniu všetkých aktívnych miest enzýmu. Aj so zvyšovaním teploty dochádza k nárastu rýchlosti enzýmovej reakcie, ale súčasne sa zvyšuje aj rýchlosť proteolytickej degradácie. Pri určitej teplote sa nárast rýchlosti enzýmovej reakcie zastavuje z dôvodu denaturácie enzýmu. Teplota, pri ktorej sa dosahuje maximálna rýchlosť enzýmovej reakcie, sa označuje ako optimálna. Podobne je rýchlosť enzýmovej reakcie závislá aj od koncentrácie protónov v reakčnom prostredí (pH) a vyznačuje sa optimom. Aktivitu enzýmu ovplyvňuje aj prítomnosť niektorých nízkomolekulových zlúčenín alebo iónov v reakčnom prostredí. Môže dochádzať k znižovaniu katalytického účinku (inhibícii enzýmu) alebo k zvyšovaniu katalytického účinku (aktivácii enzýmu).

Tabuľka 9. Hlavné triedy enzýmov podľa IUBMB.

Trieda	Názov	Katalyzovaná reakcia
EC 1	Oxidoreduktázy	oxidačno-redukčné reakcie
EC 2	Transferázy	prenos skupín atómov medzi molekulami
EC 3	Hydrolázy	hydrolytické štiepenie rôznych väzieb
EC 4	Lyázy	nehydrolytické štiepenie rôznych väzieb
EC 5	Izomerázy	intramolekulové premeny substrátu
EC 6	Ligázy	kovalentné viazanie dvoch molekúl za súčasného štiepenia ATP
EC 7	Translokázy	presun iónov alebo molekúl cez membránu

Na označenie enzýmov používame triviálne alebo systémové názvoslovie. Triviálny názov sa zvyčajne tvorí z názvu substrátu, ktorý do reakcie vstupuje, a prípony **-áza** (napr. enzým sacharáza katalyzuje hydrolýzu disacharidu sacharózy za vzniku glukózy a fruktózy). Podľa komisie IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) sa enzýmy rozdeľujú do siedmich tried na základe typu katalyzovanej enzýmovej reakcie (Tab. 9). Podtried a podpodtried je podstatne viac. Podľa systémového názvoslovie sa každému enzýmu prideluje poradové číslo a systémový názov enzýmu, ktorý zahŕňa typ reakcie i označenie substrátu a má koncovku **-áza**.

Úloha 16. Určenie substrátovej špecificity sacharázy a α -amylázy

Enzým **sacharáza** patrí medzi hydrolázy (EC 3.2.1.26; systémový názov β -D-fruktofuranozidfruktohydroláza) a okrem iných substrátov katalyzuje aj hydrolýzu sacharózy. Hydrolýzou vzniká tzv. invertný cukor, čo je ekvimolárna zmes D-glukózy a D-fruktózy. Zmes týchto dvoch monosacharidov je sladšia ako sacharáza samotná a preto sa využíva na výrobu sladených potravín. Z toho dôvodu nachádza sacharáza využitie v potravinárskom priemysle, pričom jej hlavným zdrojom sú kvasinky. Molekulová hmotnosť sacharázy izolovanej z kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* je 270 000 g/mol (270 kDa) a je stabilná pri 4 °C, uskladnená v suchom stave. Teplotné optimum enzýmu je 60 °C a pH optimum 4,5.

Amylázy sú hydrolytické enzýmy vyskytujúce sa u človeka, zvierat i rastlín. Majú využitie v technologickej praxi (liehovárstvo, pivovárstvo). Amylázy sa líšia okrem štruktúry a mechanizmu pôsobenia tiež miestom výskytu. V prípade človeka a zvierat sa α -amyláza (EC 3.2.1.1) vyskytuje v slinách a pankrease, glucoamyláza v pečeni. V rastlinách sa nachádza α a β -amyláza spoločne s glucoamylázou iba v semenách. α -amyláza štiepi reťazec polysacharidu vo vnútornej časti za vzniku dextrínov, čo sú vo vode rozpustné krátke oligosacharidy obsahujúce minimálne 4 – 6 glukózových jednotiek. Dextríny vznikajúce pôsobením amyláz možno charakterizovať na základe farebnej reakcie s jódom ako amylo-dextríny (modré) obsahujúce 30 a viac glukózových jednotiek, erytro-dextríny (červené) obsahujúce 8 – 12 glukózových jednotiek, a achroo-dextríny (zložené zo 4 – 6 glukóz), ktoré nedávajú farebnú reakciu s jódom a majú nízku molekulovú hmotnosť.

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, automatické pipety, špičky, kadičky, elektrický varič, vodný kúpeľ, predvážky, vortex

Materiál: sacharáza, škrob, pekárské droždie, sliny

Reagencie a roztoky:

Lugolov roztok – 5 g KI a 2,5 g jódu sa rozpustí v destilovanej vode a doplní do 50 ml

Fehling I – 40 g síranu meďnatého sa rozpustí v 500 ml destilovanej vody

Fehling II – 346 g vlnan sodno-draselného a 120 g NaOH sa rozpustí v 1000 ml destilovanej vody
0,1 M fosfátový pufr pH 7,2 – 5,4 g KH_2PO_4 a 10,5 g K_2HPO_4 sa rozpustí v 850 ml vody, upraví sa pH a doplní na 1000 ml.

Príprava enzýmov:

α -amyláza – k 1 ml vlastných slín pridajte 2 ml destilovanej vody

sacharáza – 0,2 g pekárskeho droždia rozsuspendujte v 40 ml destilovanej vody

Príprava substrátov:

roztok škrobu – 0,5 g škrobu rozsuspendujte v 50 ml 0,1 M fosfátového pufru a povarte 5 minút

roztok sacharózy – 1 g sacharózy rozpustite v 50 ml destilovanej vody

Pracovný postup: Podľa Tabuľky 10 napipetujte do šiestich označených skúmaviek 0,5 ml enzýmových preparátov (α -amyláza a sacharáza). Skúmavky 2 a 5 povarte 5 minút a potom do všetkých skúmaviek pridajte 2 ml škrobu alebo sacharózy (substráty). Všetky skúmavky inkubujte v termostate pri 38 °C 30 min. Po inkubácii použite 1 ml vzorky na stanovenie prítomnosti redukujúcich látok Fehlingovou reakciou. V skúmavke zmiešajte 1 ml Fehlingovej reagensie I a 1 ml Fehlingovej reagensie II s 1 ml vzorky. Opatrne povarte a pozorujte vznik oranžovo-červenej zrazeniny Cu_2O . Skúmavky so zvyškom vzorky doplňte 2 cm pod okraj destilovanou vodou a pridajte kvapku Lugolovho roztoku. Premiešajte na vortexe.

Tabuľka 10.

Skúmavka č.	1	2	3	4	5	6
amyláza (ml)	0,5	0,5	-	-	-	0,5
sacharáza (ml)	-	-	0,5	0,5	0,5	-
var 5 min	-	+	-	-	+	-
roztok škrobu (ml)	2,0	2,0	2,0	-	-	-
roztok sacharózy (ml)	-	-	-	2,0	2,0	2,0
Vyhodnotenie						
Fehlingova reakcia						
Lugolova reakcia						

Vyhodnotenie výsledkov:

1. Výsledky skúšok zapíšte do tabuľky.
2. Vyhodnoňte z hľadiska substrátovej špecificity enzým obsiahnutý v slinách a v pekárskom droždí.

Úloha 17. Určenie optimálneho pH enzýmovej reakcie α -amylázy

Enzýmy sú ako proteíny značne citlivé na zmenu koncentrácie vodíkových iónov. Väčšina proteínov je aktívna len v úzkom rozmedzí pH (5 – 9). Hodnota pH významne ovplyvňuje väzbu substrátu na enzým, katalytickú aktivitu enzýmu a ionizáciu substrátu. Zmena štruktúry proteínu je výrazná len pri extrémnych hodnotách pH, kedy môže dochádzať k ireverzibilnej denaturácii proteínu. Hodnota pH, pri ktorej rýchlosť enzýmovej reakcie najvyššia, sa označuje ako pH optimum daného enzýmu. V tejto úlohe stanovíte optimálne pH pre štiepenie škrobu α -amylázou zo slín.

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, automatické pipety, špičky, kadičky, vodný kúpeľ, predvážky

Materiál: škrob, sliny

Reagencie a roztoky:

Lugolov roztok – 5 g KI a 2,5 g jódu sa rozpustí v destilovanej vode a doplní do 50 ml

Fyziologický roztok – 9 g NaCl sa rozpustí v 1000 ml destilovanej vody

0,2 M Na_2HPO_4 – 36 g Na_2HPO_4 sa rozpustí v 500 ml destilovanej vody

0,1 M kyselina citrónová – 10,5 g kyseliny citrónovej sa rozpustí v 500 ml destilovanej vody.

Príprava enzýmu:

α -amyláza – k 1 ml vlastných slín pridajte 2 ml destilovanej vody

Príprava substrátu:

roztok škrobu – 0,5 g škrobu rozsuspendujte v 50 ml destilovanej vody a povarte 5 minút

Pracovný postup: Pipetujte 1 ml enzýmového preparátu α -amylázy zo slín do 25 ml odmernej banky a doplňte fyziologickým roztokom na 25 ml. Do série označených skúmaviek pipetujte roztok fosforečnanu sodného a kyseliny citrónovej ako je uvedené v Tabuľke 11. Získate tak sadu pufov v rozmedzí pH 3 – 8,3. Do všetkých skúmaviek pridajte 1 ml roztoku škrobu a 1 ml roztoku α -amylázy. Po premiešaní inkubujte 30 min v termostate pri 30 °C. Slepý pokus pripravte pridaním 4 ml kyseliny citrónovej, 1 ml roztoku škrobu a 1 ml roztoku α -amyláza.

Tabuľka 11.

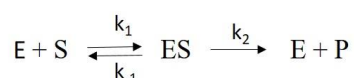
Skúmavka č.	Kyselina citrónová (ml)	Na ₂ HPO ₄ (ml)	pH	Reakcia s Lugolovým roztokom
1	4	0	Slepý pokus	
2	3,2	0,8	3	
3	2,6	1,4	4	
4	2	2	4,8	
5	1,75	2,25	5,4	
6	1,6	2,4	5,8	
7	1,1	2,9	6,6	
8	0,7	3,3	7	
9	0,25	3,75	7,6	
10	0,1	3,9	8	
11	0	4	8,3	

Po inkubácii roztoky v skúmavkách doplňte na 10 ml destilovanou vodou a pridajte kvapku Lugolovho roztoku. Vizuálne odhadnite intenzitu sfarbenia v závislosti od pH prostredia enzýmovej reakcie. Úplné rozštípenie škrobu amylázou sa prejaví po pridaní Lugolovho roztoku zmenou sfarbenia z modrého na žlté.

Vyhodnotenie: Do tabuľky uveďte stupeň rozštípenia škrobu v závislosti od pH reakčnej zmesi.

Úloha 18. Určenie V_{max} a K_m enzýmovej reakcie

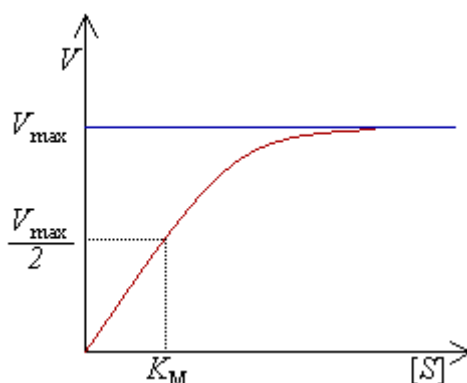
Štúdiom enzýmovej kinetiky sa zistilo, že ak je koncentrácia substrátu omnoho vyššia ako koncentrácia enzýmu, rýchlosť enzýmovej reakcie sa stáva nezávislou od koncentrácie substrátu. Existuje predstava, že celková reakcia je zložená z dvoch elementárnych reakcií. Najskôr substrát vytvára s enzýmom komplex, ktorý sa následne rozpadá na produkt a enzým podľa nasledovnej schémy:



kde k_1 je konštanta druhého poriadku (1/mol.s) a k_{-1} a k_2 sú konštanty prvého poriadku (1/s). Ak je koncentrácia produktov blízka nule (na začiatku enzýmovej reakcie), potom je rýchlosť reakcie úmerná koncentrácii komplexu ES a maximálna bude vtedy, ak sa všetok enzým viaže v komplexe enzým-substrát. Z uvedených predpokladov Michaelis a Mentenová odvodili rovnicu opisujúcu rýchlosť enzýmovej reakcie

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde v je rýchlosť reakcie, V je maximálna rýchlosť reakcie, $[S]$ je koncentrácia substrátu a K_m predstavuje Michaelisovu konštantu. Grafickým vyjadrením rovnice Michaelisa a Mentenovej (Obr. 51) dostaneme rovnoosú hyperbolu. K_m je základnou kinetickou konštantou a číselne sa rovná takej koncentrácii substrátu, pri ktorej je rýchlosť enzýmovej reakcie rovná polovici maximálnej rýchlosti. Vyjadruje sa v jednotkách koncentrácie (mol/l). Hodnota K_m sa mení nielen v závislosti od použitého enzýmu a substrátu, ale aj reakčných podmienok (pH, teplota...).

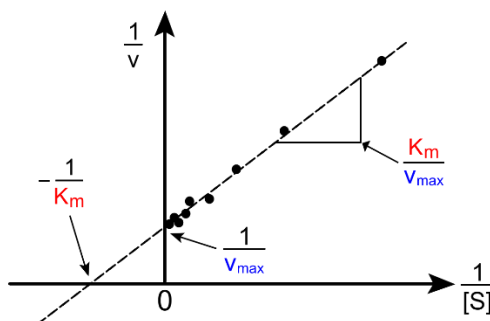


Obr. 51. Grafické znázornenie rovnice Michaelisa a Mentenovej.

Určenie hodnôt kinetických konštant vynesением závislosti počiatkovej rýchlosti od koncentrácie substrátu (Obr. 51) je graficky náročné a nepresné. Používa sa preto počítačové spracovanie týchto dát – fitovanie. Na bežné a názorné spracovanie sa navrhlo niekoľko úprav Michaelis-Mentenovej rovnice, ktoré závislosť medzi rýchlosťou reakcie a koncentráciou prevádzajú do lineárnej podoby (Obr. 52). Asi najznámejšie je recipročné vyjadrenie podľa Lineweavera a Burka:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V \cdot [S]} + \frac{[S]}{V \cdot [S]} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

Priamka pretína os $1/v$ v bode $1/V_{\max}$ a os $1/[S]$ v bode $-1/K_m$. Smernicou priamky je K_m/V_{\max} .



Obr. 52. Grafické znázornenie Michaelis-Mentenovej rovnice v úprave podľa Lineweavera a Burka.

Pomôcky: skúmavky, stojan na skúmavky, automatické pipety, špičky, kadičky, vodný kúpeľ, analytické váhy, elektrický varič, spektrofotometer, plastové kyvety, vortex

Príprava enzýmu: Čerstvé pekárenské droždie (5 g) dôkladne rozotrite s morským pieskom v trecej miske. Postupne pridajte 5 ml destilovanej vody a rozotierajte ešte 2 min. V niekoľkých dávkach pridajte ďalších 20 ml destilovanej vody, premiešajte a centrifugujte pri 4000 rpm 5 min. Supernatant (surový enzýmový preparát) zlejte do kadičky. Odoberte 3 ml preparátu a zriedte v pomere 1:1 s 0,1 M octanovým pufrom.

Reagencie a roztoky: roztok glukózy s koncentráciou 5 g/l, 0,1 M octanový tlmivý roztok, pH 5,0; roztoky sacharózy s koncentráciou 0,5 mol/l; DNS reagentia (2 g DNS rozpustíte v 40 ml roztoku NaOH s koncentráciou 2 mol/l, doplňte do 100 ml destilovanou vodou, pridajte 60 g vlnanu sodno-draselného a do 200 ml doplňte destilovanou vodou).

Pracovný postup: Do série označených skúmaviek pipetujte s použitím automatickej pipety zásobný roztok sacharózy tak, ako je uvedené v Tab. 12. Do všetkých skúmaviek pridajte požadovaný objem destilovanej vody, octanového tlmivého roztoku a 0,1 ml surového enzýmového preparátu zriedeného s octanovým pufrom v pomere 1:1. Inkubujte 15 min pri laboratórnej teplote a následne povarte 1 min vo vriacom vodnom kúpeli.

Na stanovenie redukujúcich sacharidov s DNS odoberte z každej skúmavky 0,1 ml a pridajte 0,8 ml DNS reagentie. Povarte 5 min vo vriacom vodnom kúpeli. Po ochladení pridajte 8 ml destilovanej vody, dôkladne premiešajte na vortexe a zmerajte absorbanciu pri 540 nm.

Tabuľka 12.

Skúmavka č.	1	2	3	4	5	6	Slepý pokus
Zásobný roztok sacharózy 0,5 mol/l (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5
Destilovaná H ₂ O (ml)	0,45	0,4	0,3	0,2	0,1	0	0
Koncentrácia sacharózy (mol/l)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5
Octanový tlmivý roztok 0,1 M (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
Enzýmový preparát (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
Inkubácia pri laboratórnej teplote 15 min. Po inkubácii povariť 1 min vo vriacom vodnom kúpeli. Do čistých skúmaviek odobrať 0,1 ml na stanovenie redukujúcich sacharidov.							
Skúmavka č.	1	2	3	4	5	6	Slepý pokus
Vzorka (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
DNS (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Povariť 5 minút, pridať 8 ml destilovanej vody a premiešať na vortexe. Zmerať absorbanciu pri 540 nm.							
Absorbancia pri 540 nm							

Vyhodnotenie: Výsledky merania vyneste do dvojnásobného recipročného grafu (Obr. 52) a vypočítajte hodnoty K_m a V_{max} . Závislosť $1/v$ vs. $1/[S]$ je lineárna a po preložení priamky získanými bodmi táto pretína os $1/v$ v bode $1/V_{max}$ a os $1/[S]$ v bode $-1/K_m$. Smernicou priamky je K_m/V_{max} . Namiesto prepočtu absorbancie na rýchlosť enzýmovej reakcie vyneste do grafu jej recipročnú hodnotu ($1/A$).

Príloha 1. Vzor laboratórneho protokolu

LABORATÓRNE CVIČENIE Z BIOCHÉMIE č.

Meno:	Ročník/kombinácia/skupina:
Dátum:	
Názov práce:	
Princíp + reakčná schéma:	
Pomôcky:	Chemikálie:
Pracovný postup:	

Výpočty:

Výsledky:

Pozorovanie/diskusia:

Záver:

Literatúra:

Hodnotenie:

Použitá literatúra

Eppendorf research plus – inštrukcia k obsluhu, 2019, Eppendorf AG, Germany, dostupne z: https://www.eppendorf.com/product-media/doc/sk/186591/Eppendorf_Liquid-Handling_Operating-manual_Research-plus.pdf

Ferenčík, M., Škárka, B., Novák, M., Turecký, L.: Biochémia, Slovak Academic Press, Bratislava, 2000, 924 s. ISBN 80-88908-57-4

Flurkey, W.H., Inlow, J.K.: Use of mushroom tyrosinase to introduce Michaelis-Menten enzyme kinetics to biochemistry students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 45, 2017, 270-276.

Galuszka, P., Luhová, L.: Laboratórní technika pro biochemiky. Univerzita Palackého, Olomouc, 2005, 111 s.

Gbelcová, H., Repiská, V., Shawkatová, I.: Nukleové kyseliny a proteíny – Analytické postupy a metódy. UK, Bratislava, 2017, 316 s., ISBN 978-80-223-4472-2

Leksmono, C. S., Manzoni, C., Tomkins, J. E., Lucchesi, W., Cottrell, G., Lewis, P. A.: Measuring Lactase Enzymatic Activity in the Teaching Lab. *Journal of Visualising Experiments* 138, 2018, e54377

Nairn, R., Cresswell, W., Nairn, J.: Mushroom tyrosinase: A model system to combine experimental investigation of enzyme-catalyzed reactions, data handling using R, and enzyme-inhibitor structural studies. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 43, 2015, 370-376.

Ondrejovič, M., Chmelová, D.: Laboratórne cvičenia z biochémie, FPV UCM, Trnava, 2015, 150 s., ISBN 978-80-8105-474-7

Peč, P. a kol.: Laboratórní cvičení z biochemie. Univerzita Palackého, Olomouc, 2008, 99 s.

Pečivová, M., Huong, N.T.T.: Laboratórní cvičení z biochemie. UJEP Ústí nad Labem, 2014, 47 s.

Sedlák, E., Varhač, R., Danko, P., Pulíková, H., Podhradský, D.: Praktické cvičenia z biochémie. UPJŠ Košice, Šafárik Press, 2020, 154 s. ISBN 978-80-8152-902-3

Trumbo, T.A., Schultz, E., Borland, M.G., Pugh, M.E.: Applied spectrophotometry: Analysis of a biochemical mixture. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 41, 2013, 242-250.