

1. WPROWADZENIE DO ZAJĘĆ Z BIOCHEMII

Celem tych ćwiczeń jest zapoznanie studenta ze specyfiką pracy w laboratorium biochemicznym, ze szczególnym uwzględnieniem zasad bezpieczeństwa. Studenci zapoznają się (za pisemnym potwierdzeniem) z instrukcją BHP oraz ze szczegółowymi zasadami postępowania obowiązującymi na zajęciach, które omawia prowadzący. Dla większości studentów nowością jest korzystanie z pipet automatycznych, dlatego na pierwszych ćwiczeniach uczą się posługiwania tymi pipetami. Dodatkowym celem zajęć jest sprawdzenie umiejętności przeliczania stężeń i rozwiązywania prostych zadań. Umiejętność przeliczania stężeń i sporządzania roztworów jest bowiem niezbędna w laboratorium biochemicznym oraz w toku dalszych studiów. Przykłady typowych zadań związanych z takimi przeliczeniami podano poniżej.

INSTRUKCJA BEZPIECZEŃSTWA W STUDENCKIM LABORATORIUM BIOCHEMICZNYM

I. UWAGI OGÓLNE

1. W laboratorium mogą przebywać studenci, którzy zaliczyli szkolenie ogólne BHP oraz szkolenie specjalistyczne przed rozpoczęciem zajęć danego typu (za potwierdzeniem).
2. Ćwiczenia laboratoryjne mogą odbywać się wyłącznie pod nadzorem osoby prowadzącej zajęcia; bez jej wiedzy nie wolno przeprowadzać żadnych doświadczeń.
3. Przebywając w laboratorium należy zawsze nosić fartuch laboratoryjny zapięty oraz okulary (korekcyjne lub ochronne). Długie włosy należy nosić spięte.
4. **W laboratorium występują następujące zagrożenia:**
 - 1) substancje niebezpieczne: (wysoce) łatwopalne (np. aceton F); żrące (np. kwasy i zasady stężone C), rakotwórcze i mutagenne (np. benzen, kat. 1), (bardzo) toksyczne (np. cyjanki T+), szkodliwe (Xn), drażniące (Xi), niebezpieczne dla środowiska (np. roztwory bromu N);
 - 2) czynniki chemiczne: pary substancji toksycznych (szkodliwych) drażniących w trakcie ich przelewania;
 - 3) czynniki fizyczne: promieniowanie UV emitowane przez lampę do oglądania preparatów.
5. **Karty charakterystyki** substancji i preparatów niebezpiecznych znajdują się w laboratorium na tablicy informacyjnej.

6. **Wszelkie czynności przy stosowaniu** substancji niebezpiecznych (w szczególności stężonych kwasów i zasad oraz substancji lotnych) należy wykonywać pod dygestorium, nosząc okulary i rękawice ochronne.

II. PODSTAWOWE CZYNNOŚCI PRZED ROZPOCZĘCIEM PRACY

1. Przed przystąpieniem do pracy należy zapoznać się z procedurą wykonywania doświadczenia oraz z właściwościami fizykochemicznymi stosowanych substancji i preparatów niebezpiecznych. Informacje szczegółowe znajdują się w kartach charakterystyki.

III. ZASADY BEZPIECZNEGO WYKONYWANIA PRACY

1. W celu wyeliminowania pomyłek wynikających z użycia niewłaściwych odczynników, należy wyrobić sobie nawyk dwukrotnego odczytywania etykiety na butelce.

Nie wolno pozostawiać butelek otwartych, ani odkładać korków na stół, aby nie dochodziło do zamiany korków.

Pobranych roztworów nie wolno zlewać z powrotem do butelek, z których roztwór został pobrany.

2. Wszelkie rozlania substancji niebezpiecznych należy natychmiast zetrzeć ręcznikiem papierowym.
3. Roztwory należy pobierać pipetami automatycznymi (stosując zawsze czyste końcówki) lub pipetami szklanymi zaopatrzonymi w pompkę/gruszkę gumową. Nie wolno aspirować ustami! Pipety szklane należy natychmiast opłukać. Zużyte końcówki plastikowe należy odłożyć do wyznaczonego pojemnika lub według instrukcji.
4. Płyny ogrzewane w probówce należy stale mieszać, aby nie doszło do przegrzania cieczy – co może spowodować gwałtowne jej wyrzucenie. Wylotu próbówki nie wolno kierować ani na siebie, ani na kolegów, nie należy się też nachylać nad naczyniem z ogrzewanym płynem, zaglądać do próbówki, itp.
5. Przed wirowaniem należy upewnić się, czy rotor jest wyważony (masa przeciwnych probówek lub probówek i pojemnika powinna być jednakowa), a także czy na dnie pojemnika znajdują się gumowe podkładki.
6. Przy stosowaniu lampy promieniowania UV nie wolno kierować światła lampy na oczy (wszystkie osoby w laboratorium noszą okulary ochronne).
7. Za wyjątkiem substancji wymienionych w pkt. 8. – zużyte roztwory należy wlewać do zlewu przy otwartym strumieniu wody. Zlew należy spłukać.
8. Zużyte roztwory substancji toksycznych i niebezpiecznych dla środowiska można zlewać wyłącznie do wyznaczonych pojemników. **UWAGA:** wylanie roztworu cyjanku do zlewu lub do roztworu kwaśnego może spowodować gwałtowne wydzielenie się cyjanowodoru i zatrucie ze skutkiem śmiertelnym.

9. Uszkodzone szkło laboratoryjne należy wkładać do oznakowanych worków lub pojemników – w celu utylizacji.

V. CZYNNOŚCI PO ZAKOŃCZENIU PRACY

1. Po skończonej pracy student powinien umyć szkło laboratoryjne, odstawić odczynniki na właściwe miejsce, stół laboratoryjny pozostawić czysty i suchy oraz umyć ręce wodą i mydłem.

VI. UWAGI KOŃCOWE

1. W pracowni nie wolno spożywać pokarmów i płynów, żuć gumy ani palić tytoniu (zasada ogólna).
2. W miejscu pracy należy zachowywać porządek. Na stole laboratoryjnym nie należy kłaść przedmiotów nie związanych z wykonywanym doświadczeniem (np. książek). W laboratorium należy zachować spokój.
3. Każda awaria urządzenia lub instalacji winna być niezwłocznie zgłoszona prowadzącemu. Nie wolno uruchamiać maszyn i urządzeń oznakowanych jako niesprawne.
4. **Pierwsza pomoc:** W przypadku obłania ciała substancją chemiczną należy natychmiast spłukać to miejsce obficie wodą, a dopiero potem podjąć kroki zalecane w karcie charakterystyki.

Apteczka wraz z ogólną instrukcją udzielania pierwszej pomocy znajduje się w sali nr **C 139**. Osobą odpowiedzialną za organizację udzielenia pierwszej pomocy jest pracownik prowadzący zajęcia.

5. O każdym zaistniałym wypadku studenta należy natychmiast powiadomić prowadzącego zajęcia, który ma obowiązek zawiadomić Inspektorat BHP. Jeżeli zachodzi potrzeba konsultacji lekarskiej, studentowi powinien towarzyszyć pracownik (nie inny student). Do lekarza należy zabrać kartę charakterystyki substancji, która była przyczyną wypadku. Stanowisko pracy, jeżeli nie stwarza zagrożenia, należy pozostawić w niezmiennym stanie – w celu dochodzenia przyczyn, prowadzonego przez pracowników Inspektoratu BHP UJ.
6. **Ochrona przeciwpożarowa i ewakuacja:** W laboratorium znajdują się natryski ratunkowe, służące do spłukania substancji niebezpiecznej przy obłaniu ciała. Gaśnice znajdują się w korytarzu w miejscach oznakowanych. Nie wolno zastawiać dostępu do tych urządzeń. W przypadku alarmu należy natychmiast wyłączyć urządzenia elektryczne i opuścić budynek drogą ewakuacyjną.

Zatwierdzone i podpisane kopie Instrukcji są wywieszane w studenckich laboratoriach biochemicznych.

ZASADY PIPETOWANIA NASTAWNYMI PIPETAMI AUTOMATYCZNYMI

Nastawne pipety automatyczne pozwalają na dokładne pipetowanie różnych objętości płynów. Istnieje kilka typów pipet różniących się zakresem odmierzanych objętości: 0,2–2 μl , 0,5–10 μl , 2–20 μl , 20–200 μl , 200 μl – 1 ml, 1–5 ml. W trakcie ćwiczeń z biochemii stosowane są najczęściej pipety o zakresach: 2–20 μl , 20–200 μl , 200 μl – 1 ml.

Na trzonek pipety nakłada się plastikową końcówkę. Tłoczek pipety ma dwa punkty oporu. Przy pobieraniu płynu do końcówki tłoczek naciskamy tylko do pierwszego punktu oporu, zanurzamy w roztworze, stopniowo zwalniamy tłoczek. Gdy wypuszczamy płyn z pipety tłoczek naciskamy do drugiego punktu oporu. Częstym błędem przy pipetowaniu jest naciąganie płynu przy tłoczku naciśniętym do drugiego punktu oporu – wówczas pobrana objętość płynu jest większa od nastawionej na pipecie.

Na co trzeba zwracać uwagę przy pipetowaniu:

1. Końcówka powinna być mocno osadzona na trzonku; w przeciwnym razie pipeta naciąga i płyn i powietrze a zatem objętość płynu jest mniejsza od przewidywanej.
2. Końcówkę pipety zanurzamy w pobieranym płynie jak najpłycej, aby jak najmniej płynu pozostawało na zewnętrznych ściankach końcówki. Ważne jest, aby cały czas podczas pipetowania była zanurzona w płynie.
3. Płyn pobieramy łagodnym ruchem, tak aby nie wciągnąć go do trzonka pipety (a tylko do końcówki).
4. Pipetę trzymamy skierowaną końcówką w dół; nie wolno odkładać na bok pipety z nabranym płynem.
5. Po pobraniu płynu, sprawdzamy orientacyjnie czy w końcówce jest przewidziana ilość płynu. Nabierając doświadczenia w pipetowaniu, potrafimy określić czy rzeczywiście w końcówce pipety znajduje się 2, 20 czy 200 μl . Jeśli mamy wątpliwości, powtarzamy pipetowanie.
6. Płyn wypuszczamy z pipety naciskając tłoczek do drugiego punktu oporu. Jeśli przygotowujemy rozcieńczenia i pipetujemy małe objętości, warto wypuszczać płyn od razu do rozcieńczalnika. W innym przypadku należy sprawdzić, czy kropla płynu wypuszczana z pipety znalazła się na dnie próbki i czy nie została z powrotem wciągnięta do pipety.
7. Dokładność działania pipety można okresowo sprawdzać wykorzystując wagę analityczną i ważąc pobierane przez pipetę objętości wody destylowanej.

ZAGADNIENIA DO OPRACOWANIA:

- Stężenia procentowe wagowo-wagowe (w/w) i wagowo-objętościowe (w/o).
- Stężenie molowe – jednostki (M, mM, μM , nM, pM, fM).
- Jednostki masy i objętości (kg, g, mg, μg ; dm^3 (l), cm^3 (ml), mm^3 (μl)).
- Sporządzanie roztworów, przygotowywanie rozcieńczeń.
- Prawo Lamberta-Beera.
- Zadania do opanowania.

SPOSOBY WYRAŻANIA STĘŻEŃ

1. Stężenie procentowe — odnosi się do masy substancji i masy roztworu, informuje o liczbie gramów substancji zawartej w 100 g roztworu (procent wagowo-wagowy, w/w). Zastosowanie ma również procent wagowo-objętościowy, w/o (liczba gramów substancji zawarta w 100 ml roztworu).
2. Stężenie molowe — to liczba moli substancji rozpuszczonej w 1 dm³ roztworu. Roztwór zawierający 1 mol substancji w 1 dm³ to roztwór jednomolowy, co można zapisać albo jako stężenie 1 mol/dm³ albo 1 M.

Nie należy mówić: „roztwór o stężeniu 10 milimoli” ani „roztwór 10 milimolarny”. Prawidłowe sformułowania to: roztwór dziesięciomilimolowy albo roztwór o stężeniu 10 mmoli/dm³.

Do przeliczenia stężenia molowego na procentowe albo stężenia procentowego na molowe często potrzebna jest znajomość gęstości roztworu. Gęstość roztworu wyrażamy w g/cm³ lub w kg/dm³. W przypadku roztworów wodnych o niewielkim stężeniu można przyjmując gęstość roztworu jako równą gęstości wody (1 g/cm³).

PRZYKŁADY ZADAŃ DO OPANOWANIA

3. Ile należy odważyć NaOH aby przygotować 150 ml dwumolowego roztworu?
4. Obliczyć stężenie molowe NaCl, jeśli w 200 ml roztworu znajduje się 3,5 g tego związku.
5. Stężony kwas H₂SO₄ jest 96% (procent wagowy) i ma gęstość 1,84 g/cm³. Obliczyć objętość stężonego kwasu potrzebną do sporządzenia (i) 500 ml 2 M H₂SO₄ (ii) 100 ml 12% roztworu.
6. Jak przygotować 500 ml 0,2 M roztworu HCl? Stężony HCl jest 37,5% (procent wagowy) i ma gęstość 1,19 g/cm³.
7. Ilu molowy roztwór NaOH otrzymamy po zmieszaniu 50 ml dwumolowego roztworu NaOH z 120 ml 0,75 molowego roztworu NaOH?
8. 12,5 g NaCl rozpuszczono w 150 ml H₂O. Podaj stężenie procentowe roztworu (procent wagowo-objętościowy).
9. W 120 g roztworu znajduje się 7,5 g NaCl. Ilu procentowy jest to roztwór?
10. Do 15 g 15% roztworu dodano 120 g H₂O. Podaj stężenie procentowe otrzymanego roztworu.

1.1. Przygotowanie serii roztworów K₂Cr₂O₇ o różnym stężeniu

ZASADA:

Dokładność pipetowania można sprawdzić przez pomiar absorbancji roztworów przygotowanych w oparciu o roztwór wyjściowy barwnej substancji, np. chromianu (VI) potasu.

Absorbancja (gęstość optyczna) jest miarą absorpcji promieniowania przez daną substancję i wyraża się wzorem:

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

gdzie: A — absorbancja, I₀ — natężenie światła padającego, I — natężenie światła po przejściu przez ośrodek pochłaniający światło.

Jeśli ośrodkiem pochłaniającym światło jest roztwór jakiejś substancji, to absorbancja będzie zależała od grubości warstwy ośrodka, stężenia substancji i jej właściwości optycznych. Tę zależność opisuje prawo Lamberta-Beera:

$$A = c \times l \times \epsilon$$

gdzie: A – absorbancja, c – stężenie substancji, l – grubość warstwy, przez którą przechodzi światło, ϵ – molowy współczynnik absorpcji.

Różne substancje w różnym stopniu pochłaniają światło o różnej długości fali. Dla każdej substancji można wyznaczyć molowy współczynnik absorpcji światła o danej długości fali. Jest on równy absorbancji jaką wykazuje roztwór substancji o stężeniu 1 mol/dm³ przy grubości warstwy równej 1 cm.

Znając molowy współczynnik absorpcji dla danej substancji i mierząc absorbancję roztworu tej substancji można obliczyć jej stężenie.

Ponieważ absorbancja jest wprost proporcjonalna do stężenia substancji, można pomiar absorbancji roztworów wykorzystać do sprawdzenia dokładności pipetowania.

WYKONANIE A (z użyciem probówek i spektrofotometru):

Przygotować 5 probówek i do każdej odpipetować po 1 ml wody. Przygotować serię różnych stężeń chromianu dodając do powyższych probówek 2, 4, 6, 8, 10 ml wyjściowego roztworu K₂Cr₂O₇ (20 mg/ml). Zmierzyć absorbancję roztworów przy długości fali 410 nm względem wody. Wykreślić krzywą zależności absorbancji od stężenia K₂Cr₂O₇. Pierwszy punkt krzywej to punkt o współrzędnych (0, 0). Jeśli któryś z punktów doświadczalnych odbiega znacząco (o 20%) od wartości wyznaczonej z równania otrzymanej prostej, powtórzycie doświadczenie.

WYKONANIE B (z użyciem 96-studzienkowej mikro płytki testowej, przedstawionej na poniższym schemacie i czytnika do mikro płytek):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Studenci pracujący w podgrupach mogą kolejno korzystać z tej samej płytki. Pierwsza podgrupa studentów wykorzystuje rząd 1 i 2, druga podgrupa rząd 3 i 4, trzecia – 5 i 6 itd.

Do dwóch kolejnych studzienek w szeregu A (np. A1 i A2) odpipetować po 200 μl wody, do dwóch studzienek szeregu B po 198 μl wody i do kolejnych studzienek szeregów C, D, E i F odpipetować odpowiednio po 196, 194, 192 i 190 μl wody. Następnie do dwóch studzienek szeregu B zawierających wodę odpipetować po 2 μl roztworu wyjściowego $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (20 mg/ml); do studzienek szeregu C – po 4 μl i do studzienek kolejnych szeregów: po 6, 8 i 10 μl roztworu wyjściowego $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Zmierzyć absorbancję roztworów na czytniku do płytek przy 410 nm względem wody. Obliczyć średnią absorbancję i odchylenie standardowe dla duplikatów przygotowanych dla każdego rozcieńczenia. Wartość odchylenia standardowego nie powinna przekraczać 10% wartości zmierzonych absorbancji. Wykreślić krzywą zależności absorbancji od stężenia $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Pierwszy punkt krzywej to punkt o współrzędnych (0, 0). Powtórzyć doświadczenie, jeśli dla któregoś z punktów odchylenie standardowe przekracza 20% wartości absorbancji lub któryś z punktów doświadczalnych odbiega znacząco od wartości wyznaczonej z równania otrzymanej prostej.

UWAGA: należy unikać tworzenia baniek powietrza w studzienkach.

1.2. Metoda seryjnych rozcieńczeń

ZASADA:

W wielu doświadczeniach wykorzystuje się seryjne rozcieńczenia badanych preparatów lub standardów. Przygotowuje się kilka roztworów, w których stężenie danej substancji w próbce nr 1 jest wielokrotnością stężenia tej substancji w próbce nr 2, które z kolei jest tą samą wielokrotnością stężenia w próbce 3 itd. Na przykład można przygotować serię dwukrotnych albo dziesięciokrotnych rozcieńczeń roztworu wyjściowego. Przy serii dwukrotnych rozcieńczeń roztworu o stężeniu 1%, uzyskamy roztwory: 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,0625%; 0,0313% itd.

Przy serii dziesięciokrotnych rozcieńczeń roztworu 100 mM uzyskamy roztwory o stężeniach: 10 mM, 1 mM, 100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM itd.

WYKONANIE:

Przygotować 2 ml 25 \times rozcieńczonego wyjściowego roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (80 μl + 1,920 ml wody) – probówka nr 1. Jakie jest stężenie $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ w tym roztworze? Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń tego roztworu. Do 5 probówek (oznaczonych numerami 2–6) odmierzyć po 1 ml wody. Z probówki nr 1 pobrać 1 ml roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ i przenieść do probówki nr 2, wymieszać zawartość probówki, pobrać 1 ml i przenieść do probówki nr 3. Wymieszać zawartość probówki nr 3 i przenieść 1 ml do probówki nr 4 itd. Zmierzyć absorbancję roztworów przy 410 nm, względem wody. Wykreślić krzywą zależności absorbancji od stężenia $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Pierwszy punkt krzywej to punkt o współrzędnych (0,0). Powtórzyć doświadczenie, jeśli któryś z punktów doświadczalnych odbiega znacząco od wartości wyznaczonej z równania otrzymanej prostej.

ODCZYNNIKI:

Roztwór $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o stężeniu 20 mg/ml.

SPRZĘT LABORATORYJNY:

Spektrofotometr, czytnik do mikropłytek.