

Metody fizyczne w biologii

Skrypt do ćwiczeń

2012-10-05

Spis treści

Podstawy teoretyczne	3
Podstawowe techniki i urządzenia	3
Pipeta automatyczna.....	3
Wstęp do opracowania wyników eksperymentalnych	4
Niepewność pomiarów i rodzaje błędów popełnianych podczas pomiarów	4
Wykrywanie wyników wątpliwych – test Q Dixona	6
Test t Studenta dla jednej średniej.....	7
Kalibracja metody analitycznej.....	8
Zależności liniowe i równanie regresji liniowej	10
Ocena jakości krzywej kalibracyjnej	11
Zestawy ćwiczeń do wykonania	14
Zestaw 1 (Pipetowanie i analiza statystyczna wyników).....	14
Ćwiczenie 1: Nauka prawidłowego i dokładnego pipetowania.....	14
Ćwiczenie 2. Sprawdzanie kalibracji pipety automatycznej.	14
Ćwiczenie 3. Pomiar gęstości roztworu sacharozy.....	15
Ćwiczenie 4. Oznaczanie zawartości cukrów redukujących w miodzie.....	16
Zestaw 2 (Fracjonowanie komórki)	17
Ćwiczenie 1: Izolacja chloroplastów	17
Zestaw 3 (Miareczkowanie pH-metryczne).....	19
Ćwiczenie 1: Miareczkowanie potencjometryczne aminokwasów	19
Ćwiczenie 2: Wyznaczanie pojemności buforowej buforu octanowego.....	20
Ćwiczenie 3: Charakterystyka elektrody szklanej.....	21
Zestaw 4 (Spektrometria).....	22
Ćwiczenie 1: Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji.....	22
Ćwiczenie 2: Wpływ pH na własności spektralne związków chemicznych	23
Ćwiczenie 3: Wpływ stopnia utlenienia na własności spektralne związków chemicznych	24

Podstawy teoretyczne

Podstawowe techniki i urządzenia

Pipeta automatyczna

Pipeta automatyczna jest urządzeniem, które służy do precyzyjnego odmierzenia określonej objętości cieczy. Jest to jedno z najbardziej podstawowych i najczęściej wykorzystywanych narzędzi w laboratorium biologii molekularnej i biotechnologii. Wyróżnić można dwa typy pipet: pipety o stałej objętości dozowanej cieczy i o zmiennej objętości dozowanej cieczy (pipety nastawne). Pipety nastawne obecnie są znacznie popularniejsze w użyciu, gdyż umożliwiają odmierzenie dowolnej objętości cieczy w obsługiwanym zakresie. Dwa najważniejsze elementy pipety to pokrętko do ustawiania żądanej objętości (w przypadku pipety nastawnej) oraz tłoczek, za pomocą którego pobiera się i wypuszcza określoną objętość cieczy. Pipeta posiada określony zakres pipetowanej objętości (np. 20-200 μl , 100-1000 μl). Tak więc, do odmierzenia określonej objętości należy dobrać pipetę w odpowiednim zakresie pipetowania. Należy przy tym pamiętać, że bardziej precyzyjnie odmierza objętość przy jej górnym zakresie niż przy dolnym. Jeżeli masz do dyspozycji dwie pipety (np. o zakresie 2-20 μl i 10-100 μl) to do pobrania np. 15 μl cieczy lepiej użyć pipety o mniejszym zakresie (15 μl jest przy jej górnym zakresie) niż o większym zakresie (15 μl jest przy jej dolnym zakresie).

Prawidłowe korzystanie z pipety automatycznej nie jest takie proste i wymaga pewnej wprawy i znajomości kilku zasad, bez przestrzegania których odmierzane objętości będą obarczone dużym błędem. Stan pipety automatycznej i prawidłowość odmierzanej cieczy należy okresowo sprawdzać i w razie potrzeby pipetę należy kalibrować. Można to zrobić samodzielnie (niezalecane dla początkujących osób) lub skorzystać z usług wyspecjalizowanego serwisu. Poniżej przedstawiono dwa sposoby pipetowania pozwalające na prawidłowe pobranie określonej objętości cieczy: pipetowanie proste i odwrotne (różnicowe). Pipetowanie różnicowe jest zalecany w przypadku pipetowania bardzo małych objętości lub w przypadku pipetowania cieczy o zwiększonej lepkości.

PIPETOWANIE PROSTE

- 1) Nałóż odpowiednią końcówkę.
- 2) Naciśnij tłoczek pipety do pierwszego oporu.
- 3) Zanurz końcówkę pipety pod powierzchnię pipetowanej cieczy na głębokość kilku milimetrów (nie należy wkładać końcówki głęboko pod powierzchnię, gdyż po jej wyjęciu na zewnętrznych ściankach może zostać duża ilość cieczy, która znacząco zwiększy niedokładność pipetowania).
- 4) Delikatnie zwolnij tłoczek i chwilę odczekaj (2 sekundy).
- 5) Wyjmij końcówkę dotykając brzegów naczynia (pozwoli to na łatwe usunięcie nadmiaru cieczy, który zgromadził się na zewnętrznych ściankach końcówki).
- 6) Przenieś pobraną ciecz do naczynia docelowego i naciśnij tłoczek do pierwszego oporu. Kończówka pipety powinna dotykać ścianki naczynia.
- 7) Naciśnij tłoczek do drugiego oporu (pozwala na usunięcie resztek cieczy z końcówki i wyjmij pipetę z naczynia).
- 8) Zwolnij tłoczek i usuń końcówkę.

PIPETOWANIE ODWROTNE

- 1) Nałóż odpowiednią końcówkę.
- 2) Naciśnij tłoczek pipety do drugiego oporu.
- 3) Zanurz końcówkę pipety pod powierzchnię pipetowanej cieczy na głębokość kilku milimetrów.

- 4) Delikatnie zwolnij tłoczek i chwilę odczekaj.
- 5) Wyjmij końcówkę dotykając brzegów naczynia.
- 6) Przenieś pobraną ciecz do naczynia docelowego i naciśnij tłoczek do pierwszego oporu.
- 7) Nie puszczając tłoczka przenieś pipetę do naczynia wyjściowego i naciśnij tłoczek do drugiego oporu. Końcówka pipety powinna dotykać ścianki naczynia.
- 8) Zwolnij tłoczek i usuń końcówkę.

ZALECENIA DODATKOWE

- Przed właściwym pipetowaniem zalecane jest kilkukrotne (3-5 razy) przepłukanie końcówki pipetowaną cieczą. Jest to szczególnie ważne przy pipetowaniu cieczy lepkich i mających gęstość inną niż woda;
- W miarę możliwości pipety, końcówki oraz pipetowane ciecze powinny mieć zrównoważone temperatury;
- Pipety używaj wyłącznie z odpowiednio nałożoną końcówką;
- Zawsze używaj końcówek przeznaczonych do danego typu i modelu pipety;
- Podczas pipetowania pipeta powinna być trzymana pionowo;
- Ciecz pobieraj powolnym, płynnym ruchem tłoczka. Gwałtowne puszczenie tłoczka może spowodować zassanie cieczy do wnętrza pipety i jej nieodwracalne uszkodzenie lub konieczność czyszczenia i kalibracji!
- Nigdy nie kładź pipety z nabrana cieczą poziomo. Ciecz może wlać się do wnętrza pipety!
- Nigdy nie odkładaj pipety na brzegu stołu, tak aby wystawała poza obręb stołu. Taką pipetę można przypadkowo strącić na ziemię, co może doprowadzić do jej nieodwracalnego uszkodzenia!
- Nie trzymaj pipety w ręce bez potrzeby. Powoduje to jej niepotrzebne ogrzewanie. Poza tym taka pipeta może przypadkowo wypaść z rąk.
- Nigdy nie nastawiaj objętości poza wyznaczoną skalę, gdyż może to doprowadzić do rozkalibrowania pipety lub jej uszkodzenia.
- W przypadku pipetowania lepkich cieczy końcówkę z zewnątrz można delikatnie wytrzeć ręcznikiem papierowym (usunięcie nadmiaru cieczy).
- Nie zanurzaj pipety głęboko w pipetowanej cieczy, gdyż na zewnętrznych ściankach może gromadzić się dodatkowa porcja cieczy, co zwiększa niedokładność pipetowania.
- Pamiętaj o zmianie końcówek przy pipetowaniu różnych odczynników, aby nie spowodować ich zanieczyszczenia.
- Pamiętaj, aby podczas dozowania cieczy nie zanurzać końcówki (nie dotyczy pipetowania małych objętości). W przypadku dozowania małych objętości (kilkadziesiąt mikrolitrów i mniej) można końcówką pipety dotknąć powierzchni cieczy (ale nie zanurzać końcówki głęboko pod powierzchnię).

Wstęp do opracowania wyników eksperymentalnych

Niepewność pomiarów i rodzaje błędów popełnianych podczas pomiarów

Każdy eksperyment naukowy składa się z szeregu czynności laboratoryjnych, które powinno się wykonać z należytą starannością. Bardzo często czynnością laboratoryjną jest pomiar określonej wielkości fizycznej, np. ważenie odczynnika, odmierzanie określonej objętości cieczy, pomiar pH, absorbancji itp. **Pomiarem** określa się zbiór czynności wykonanych w celu ustalenia wartości określonej wielkości fizycznej. Zazwyczaj dokonuje się tego poprzez porównanie mierzonej wartości z ustalonym wzorcem. Podczas wykonywania pomiaru może dojść do popełnienia różnego rodzaju błędów, które sprawiają, że zmierzona wartość x wielkości fizycznej różni się od prawdziwej miary x_0 .
Różnicę

$$\delta = x - x_0 \quad (1)$$

nazywamy **błędem bezwzględnym** zmierzonej wielkości fizycznej lub też **błędem (niepewnością) pomiaru**. Błąd pomiaru można też wyrazić w postaci błędu względnego $\frac{\delta}{x_0}$ lub błędu procentowego $\frac{\delta}{x_0} 100\%$.

Błędy popełniane podczas pomiaru wielkości mają różne przyczyny. Mogą one wynikać z niedoskonałości stosowanych przyrządów, niewłaściwego ich skalibrowania lub obsługi, niedoskonałości zmysłów eksperymentatora, czynników losowych (np. skoki napięcia w sieci elektrycznej). Na odczytywaną wartość mogą mieć wpływ czynniki zewnętrzne, np. temperatura, wilgotność powietrza, jakość stosowanych wzorów itp. Wszystko to sprawia, że uzyskiwane wyniki oscylują (są rozrzucone) wokół pewnej wartości. Na błąd pomiaru mogą się złożyć trzy rodzaje błędów: **błędy przypadkowe, błędy systematyczne i błędy grube**:

$$\delta = \delta_p + \delta_{sys} + \delta_{gr} \quad (2)$$

Błędy przypadkowe wynikają z wpływu czynników losowych, niekontrolowanych przez eksperymentatora, np. skoków napięcia w sieci elektrycznej, dokładności odczytu wartości przez eksperymentatora, drgania podłoża itp. Błędy te nie muszą się pojawiać podczas każdego pomiaru, lub mogą pojawiać się z różną siłą. Błędy przypadkowe mogą mieć różny znak, czyli raz powodować zawyżenie a innym razem zaniżenie mierzonej wielkości fizycznej. Aby zmniejszyć wpływ błędów przypadkowych na wynik pomiaru określonej wielkości fizycznej nie wykonuje się pojedynczego pomiaru lecz wykonuje się serię kilku pomiarów uzyskując serię wyników stanowiących tzw. próbę $x_1, x_2, \dots, x_n$ (gdzie n to ilość pomiarów). Następnie z uzyskanych wyników oblicza się średnią arytmetyczną, której wartość jest najbardziej zbliżona do wartości prawdziwej.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} x_i \quad (3)$$

gdzie x_i to kolejny pomiar.

Z kolei wyrażenie

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2} \quad (4)$$

nazywane odchyleniem standardowym jest miarą **błędu (niepewności) pojedynczego wyniku pomiaru**. Natomiast miarą **błędu** obliczonej **średniej arytmetycznej** jest wyrażenie

$$s_d = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

Jak widać błąd średniej arytmetycznej maleje wraz ze wzrostem ilości dokonanych pomiarów. Zatem, im więcej pomiarów, tym średnia arytmetyczna dokładniej odpowiada wartości prawdziwej. Zwiększenie ilości dokonywanych pomiarów jest najprostszym sposobem na dokładniejsze zmierzenie danej wielkości fizycznej i zmniejszeniem wpływu błędów przypadkowych.

Błędy systematyczne mogą wynikać z niedokładności przyrządów pomiarowych, ich niewłaściwej kalibracji lub obsługi (np. spieszący się stoper, odczytywania wartości na mierniku analogowym (tzw. wskazówkowym) pod niewłaściwym kontem, niewłaściwe wyzerowanie spektrofotometru, wytarowanie wagi, itp.). Cechą błędu systematycznego jest to, że się stale powtarza i posiada taki sam znak (tzn. mierzona wartość fizyczna jest stale zawyżana lub zaniżana). Dodawana wartość może być zawsze taka sama (**błąd systematyczny stały**) lub być proporcjonalna do mierzonej wartości (**błąd systematyczny zmienny**). Błąd systematycznie wpływa na uzyskaną

wartość mierzonej wielkości fizycznej i nie może być wyeliminowany poprzez zwiększenie ilości pomiarów. Aby sprawdzić, czy dany przyrząd lub metoda analityczna jest obciążona błędem systematycznym należy wykonać serię kilku – kilkunastu pomiarów, obliczyć średnią i odchylenie standardowe, a następnie sprawdzić, czy obliczona średnia w sposób istotny statystycznie różni się od wartości prawdziwej. Do sprawdzenia istotnej różnicy stosuje się test t Studenta (zobacz poniżej).

Błędy grube zazwyczaj są spowodowane poważnymi błędami lub niestarannością pracy eksperymentatora lub wadliwym działaniem urządzenia pomiarowego. Przykłady takich błędów to np. nieprawidłowe włożenie kuwety do spektrofotometru, złe nastawienie pipety automatycznej (np. odmierzenie 20 μ l cieczy zamiast 200 μ l) itp. Zazwyczaj wynik obciążony błędem grubym znacząco różni się od pozostałych wyników. Zatem, najłatwiejszym sposobem na wykrycie błędu grubego jest wykonanie serii kilku-kilkunastu pomiarów, uporządkowanie ich rosnąco (lub malejąco) i poszukanie wśród wyników skrajnych tzw. **wyników wątpliwych** (niepewnych lub podejrzanych). Takie wyniki powinno się odrzucić z analizy. Jednak wyników wątpliwych nie powinno się odrzucać według własnego uznania. Wyniki skrajne mają duży wpływ na wartość średniej i odchylenia standardowego. Uznanie wyniku skrajnego za wątpliwy i jego odrzucenie może się przyczynić do zafałszowania obliczeń i uzyskanych wyników pomiarów. Opracowano kilka metod wykrywania wyników niepewnych. Jedną z nich jest zastosowanie określonego testu statystycznego – testu Q Dixona lub testu Grubbsa. Ze względu na prostotę najczęściej stosuje się test Q Dixona (opisany poniżej).

Wykrywanie wyników wątpliwych – test Q Dixona

Czasami się zdarza, że w uzyskanej serii pomiarów jest jeden lub dwa wyniki, których wartości znacznie odbiegają od pozostałych wyników. Takie wartości mogły się pojawić w wyniku zaistnienia błędów grubych i powinny zostać odrzucone z dalszych obliczeń, jako wyniki wątpliwe. Dlatego też jedną z pierwszych czynności wykonywanych podczas analizy danych eksperymentalnych jest zastosowanie testu statystycznego pozwalającego wykryć i wyeliminować wyniki wątpliwe. Do tego celu służy test Q Dixona, który sprawdza, czy wynik skrajny (najmniejszy lub największy) jest wynikiem wątpliwym.

W pierwszej kolejności należy uzyskane wyniki uporządkować rosnąco, a następnie policzyć odpowiednie statystyki (tzw. liczby Q):

$$Q_l = \frac{x_2 - x_1}{R} \text{ oraz } Q_p = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (6)$$

gdzie R to tzw. rozstęp (różnica pomiędzy wartością największą i najmniejszą)

$$R = x_{max} - x_{min}$$

x_1 – wynik najmniejszy (skrajny)

x_2 – wynik drugi w kolejności

x_n – wynik największy (skrajny)

x_{n-1} – wynik przedostatni.

Wynik uznaje się za wątpliwy z określonym prawdopodobieństwem i odrzuca, jeżeli wartość statystyk Q_l i Q_p jest większa od tabelarycznej tzw. **wartości krytycznej**. Poniżej w tabeli są podane wartości krytyczne pozwalające odrzucać wyniki wątpliwe na poziomie istotności $\alpha = 5\%$. Taki poziom istotności pozwala stwierdzić, że jeżeli wartość statystyki Q jest większa od wartości krytycznej to z prawdopodobieństwem 95% wynik skrajny jest wynikiem wątpliwym i powinien być wykluczony z dalszych analiz.

Tabela 1. Wartości krytyczne Q_t dla testu Dixona. n – ilość pomiarów (wielkość próby).

n	Q_t	n	Q_t	n	Q_t
3	0,941	11	0,392	21	0,295
4	0,765	12	0,376	22	0,290
5	0,642	13	0,361	23	0,285
6	0,560	14	0,349	24	0,281
7	0,507	15	0,338	25	0,277
8	0,468	16	0,329	26	0,273
9	0,437	17	0,320	27	0,269
10	0,412	18	0,313	28	0,266
		19	0,306	29	0,263
		20	0,300	30	0,260

Test t Studenta dla jednej średniej

Test t Studenta jest jednym z podstawowych testów statystycznych. Stosowany jest on w celu sprawdzenia, czy pomiędzy dwie średnie arytmetyczne różnią się między sobą w sposób istotny statystycznie. Istnieje kilka odmian testu t Studenta. Poniżej zostanie przedstawiony **dwustronny test t Studenta o średniej arytmetycznej**, który służy do sprawdzenia, czy obliczona na podstawie **próby (zbioru uzyskanych wyników)** średnia arytmetyczna istotnie różni się od wartości teoretycznej. Zdając sobie sprawę, że studenci nie posiadają jeszcze odpowiedniej wiedzy teoretycznej z zakresu statystyki do pełnego zrozumienia idei, założeń testów statystycznych, test t Studenta zostanie przedstawiony w dużym uproszczeniu pozwalającym jednak na jego prawidłowe zastosowanie i wyciągnięcie odpowiedniego wniosku.

Test t-Studenta o średniej arytmetycznej testuje następującą tzw. **hipotezę zerową** i **hipotezę alternatywną**:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_A: \mu \neq \mu_0$$

μ jest wartością średnią z tzw. badanej **populacji** (w tym przypadku będzie to zbiór wszystkich możliwych do uzyskania wyników). Wartość μ jest nieznaną i jest reprezentowana przez średnią $\bar{x}$ z próby wywodzącej się z populacji (w tym przypadku próbą jest zbiór wyników uzyskanych w trakcie eksperymentu). Natomiast μ_0 jest spodziewaną **wartością teoretyczną**. W uproszczeniu, test t Studenta o średniej arytmetycznej sprawdza, czy prawdziwa jest hipoteza zerowa (brak istotnej różnicy pomiędzy uzyskaną wartością średniej a wartością teoretyczną), czy alternatywna (uzyskana wartość średniej istotnie różni się od wartości teoretycznej). Postępowanie jest następujące:

- 1) Obliczyć średnią $\bar{x}$ i odchylenie standardowe s z uzyskanych wyników według wzorów zamieszczonych powyżej.
- 2) Obliczyć statystykę testu t_d :

$$t_d = \frac{|\bar{x} - \mu_0|}{s/\sqrt{n}} \quad (7)$$

- 3) Odczytać wartość krytyczną z poniższej tabeli. Do odczytania wartości krytycznej konieczna jest znajomość tzw. liczby stopni swobody **df**. W przypadku testu t Studenta o średniej arytmetycznej wartość **df** oblicza się ze wzoru:

$$df = n - 1$$

- 4) Porównać uzyskaną wartość statystyki z odczytaną wartością krytyczną. Jeżeli wartość t_d jest mniejsza od wartości krytycznej uznaje się, że uzyskana średnia nie różni się w sposób istotny

od wartości teoretycznej (prawdziwa jest hipoteza zerowa). Jeżeli wartość statystyki t_d jest większa od wartości krytycznej uznaje się, że z prawdopodobieństwem $100\%-\alpha$ (gdzie α to **poziom istotności testu**) hipoteza zerowa jest nieprawdziwa i przyjmuje się hipotezę alternatywną, co jest równe ze stwierdzeniem, że uzyskana średnia istotnie różni się od wartości teoretycznej. Zazwyczaj ustala się wartość α na 5%.

Tabela 2. Wartości krytyczne dla dwustronnego testu t Studenta dla poziomu istotności $\alpha=5\%$, df – liczba stopni swobody

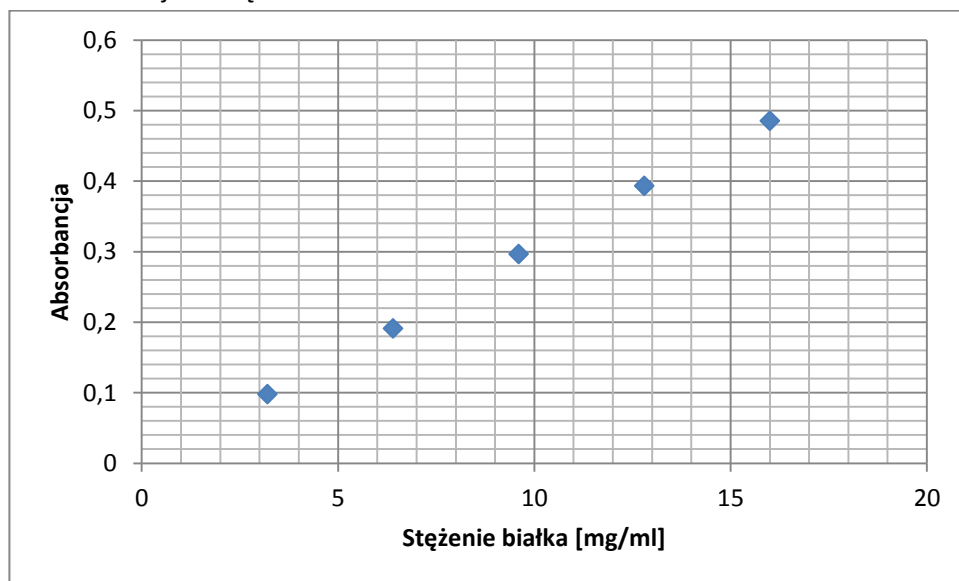
df	t_{kr}	df	t_{kr}
1	12,706	18	2,101
2	4,303	19	2,093
3	3,182	20	2,086
4	2,776	21	2,080
5	2,571	22	2,074
6	2,447	23	2,069
7	2,365	24	2,064
8	2,306	25	2,060
9	2,262	26	2,056
10	2,228	27	2,052
11	2,201	28	2,048
12	2,179	29	2,045
13	2,160	30	2,042
14	2,145	40	2,021
15	2,131	60	2,000
16	2,120	120	1,980
17	2,110	∞	1,960

Kalibracja metody analitycznej

Podstawą wielu eksperymentów naukowych jest analiza składu i stężenia określonych związków (analitów) zawartych w badanej próbce, którą określa się mianem **analizy chemicznej**. Zależnie od mierzonego parametru analizę chemiczną można podzielić na **analizę jakościową** (badanie składu próbki) oraz **analizę ilościową** (badanie stężenia określonego związku). Sposób, według którego dokonuje się analizy chemicznej nazywa się **metodą analityczną**. Wiele metod analitycznych to tzw. **metody instrumentalne**, wykorzystujące użycie określonego przyrządu pomiarowego, mierzącego określone właściwości fizyko-chemiczne badanej próbki. Do takich przyrządów należą m.in. spektrometr, chromatograf, pH-metr i wiele innych. Metody instrumentalne najczęściej są tzw. metodami porównawczymi, czyli takimi, w których mierzony parametr fizyczny (np. absorbancja) jest funkcją stężenia określonego związku obecnego w badanej próbce. Przed użyciem takiej metody należy dokonać jej **kalibracji**.

Kalibracja metody analitycznej to szereg czynności, które mają na celu precyzyjne określenie zależności pomiędzy mierzonymi wartościami wielkości fizycznej na użytym przyrządzie, a stężeniem określonego związku w próbce. Jedną z metod kalibracji jest sporządzenie tzw. **krzywej kalibracyjnej** nazywanej również **krzywą wzorcową**. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej zaczyna się od przygotowania szeregu roztworów wzorcowych (zazwyczaj 5-8), których stężenia powinny być tak dobrane, aby pokryć możliwie szeroki zakres możliwych stężeń analitu w badanej próbce. Następnie dokonuje się pomiarów określonej wielkości fizycznej (np. absorbancji, przewodności roztworu, pH

itp.). Po wykonaniu pomiarów sporządza się wykres zależności zmierzonych wartości wielkości fizycznej (oś **Y**) od stężenia roztworów wzorcowych (oś **X**). Poniżej podany jest przykładowy wykres zależności absorbancji od stężenia białka w roztworze.



Wykres 1) Zależność absorbancji od stężenia białka.

Po sporządzeniu wykresu można zobaczyć, jaki charakter zależności występuje pomiędzy dwiema zmiennymi zaznaczonymi na osiach X i Y. W przyrodzie są znane różne **typy zależności** (korelacji), które ogólnie można podzielić na **zależności liniowe** i **nieliniowe**. Znając typ zależności pomiędzy dwiema zmiennymi można dopasować odpowiedni model matematyczny, który umożliwi przewidywanie wartości jednej zmiennej na podstawie wartości drugiej zmiennej. W tym przypadku, na podstawie zmierzonej wartości fizycznej (absorbancji) można obliczyć stężenie analitu (białka) w badanej próbce. Proces ustalania zależności pomiędzy badanymi zmiennymi mający na celu przewidywanie wartości jednej zmiennej na podstawie wartości innych zmiennych określa się mianem **regresji**.

Należy pamiętać, aby danej metody analitycznej używać do pomiaru stężeń analitu tylko w takim zakresie stężeń, dla którego została przygotowana krzywa kalibracyjna. Nie wiadomo bowiem, czy ten sam model matematyczny opisuje zależność pomiędzy zmiennymi w zakresie stężeń, który nie został przebadany. Na przykład, często powyżej określonych stężeń zależność pomiędzy stężeniem a mierzoną wielkością fizyczną przestaje być liniowa. Z kolei poniżej dolnej granicy może się okazać, że stężenie analitu jest zbyt niskie, aby było możliwe do wykrycia daną metodą.

Roztwory wzorcowe powinny być przygotowane w taki sam sposób, jak badana próbka (tzn. przy zastosowaniu tych samych rozpuszczalników, lub ich mieszanek, tych samych stężeń buforów i innych związków pomocniczych), gdyż otoczenie badanej substancji może mieć wpływ na wartość mierzonej wielkości fizycznej. Na przykład, absorbancja danego związku może zależeć od rodzaju rozpuszczalnika, pH roztworu, warunków oksydoredukcyjnych itp. To samo dotyczy tzw. **ślepej próby** lub **próby odniesienia**, czyli próby w której stężenie analitu wynosi 0. Stworzenie takiego samego środowiska dla badanych próbek, roztworów wzorcowych i próby odniesienia jest niezbędnym warunkiem tego, aby uzyskane wyniki były wiarygodne. Należy mieć również na uwadze, że na mierzoną wartość wielkości fizycznej mogą mieć wpływ inne związki występujące w próbce, co może prowadzić do zafałszowania uzyskiwanych wyników. Na przykład, obecność detergentów, lub

związków redukujących w próbce silnie zakłóca lub wręcz uniemożliwia pomiar stężenia białka przy użyciu większości metod kolorymetrycznych (np. metody Bradford).

Zależności liniowe i równanie regresji liniowej

W przyrodzie bardzo często wartości różnych wielkości fizycznych są ze sobą powiązane, czyli **skorelowane**. Na przykład, absorbancja roztworu zależy od jego stężenia, szybkość fotosyntezy zależy od natężenia światła itp. Istnienie tych korelacji wynika z działania określonych praw fizyki. Zależności pomiędzy różnymi wielkościami fizycznymi często mają bardzo złożony charakter. Jednak w wielu przypadkach w pewnych zakresach wartości zależności złożone (nieliniowe) można **przybliżyć** (dokonać **aproksymacji**) zależnościami prostszymi. Jedną z najczęściej stosowanych aproksymacji jest aproksymacja do zależności liniowej. O zależnościach liniowych mówi się wtedy, gdy wartości dwóch zmiennych (np. absorbancja i stężenie związku) są do siebie proporcjonalne. Zależność liniowa jest opisywana równaniem liniowym:

$$Y = aX + b \quad (8)$$

gdzie a i b to współczynniki równania liniowego nazywane odpowiednio współczynnikiem kierunkowym i wyrazem wolnym.

Równanie prostej liniowej i regresja liniowa (sporządzenie modelu liniowego) są bardzo często wykorzystywane przy sporządzaniu krzywych kalibracyjnych. Jest to związane z tym, że zazwyczaj w pewnym zakresie stężeń mierzona wartość fizyczna jest proporcjonalna do stężenia badanego związku. Innymi słowy, pomiędzy tymi dwiema zmiennymi istnieje **zależność liniowa**. W przypadku metody analitycznej wartość współczynnika b określa wartość mierzonej wielkości fizycznej dla tzw. **próby odniesienia**. W wielu przypadkach wartość współczynnika b powinna wynosić 0. Przykładowo, absorbancja dla próby odniesienia przy dobrze wyzerowanym spektrofotometrze powinna wynosić 0. Współczynnik kierunkowy a opisujący nachylenie krzywej wzorcowej jest jednocześnie miarą czułości metody – im metoda jest czulsza, tym większa wartość współczynnika a .

Znając współczynniki a i b można na podstawie zmierzonej wartości fizycznej (np. absorpcji) obliczyć stężenie określonego związku (np. białka) w badanej próbce. Współczynniki a i b można obliczyć stosując metodę najmniejszych kwadratów. Poniżej przedstawione są odpowiednie wzory:

$$a = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad (9)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \sum_{i=1}^n x_i^2 - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad (10)$$

gdzie

n – ilość sporządzonych wzorców

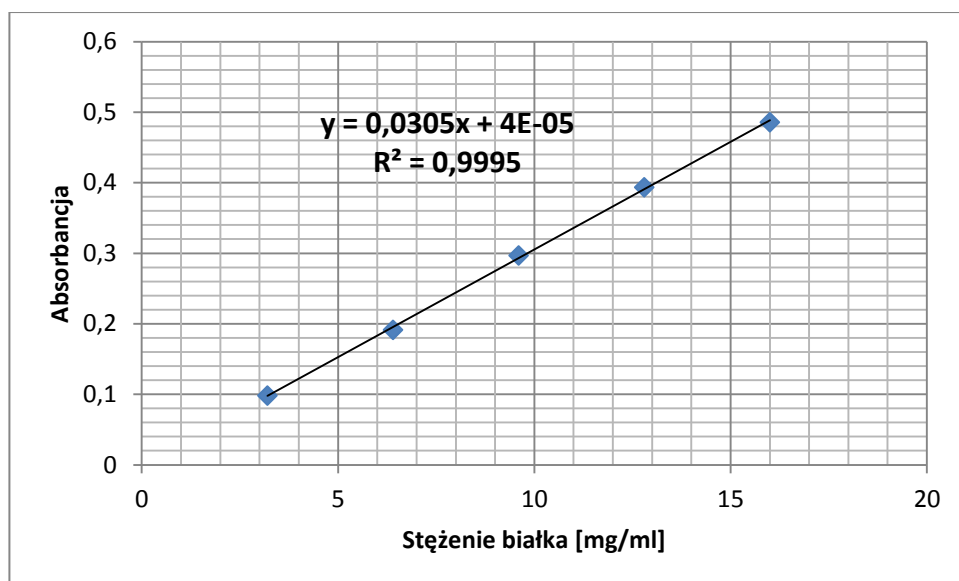
x_i – stężenie kolejnego wzorca

y_i – zmierzona wartość wielkości fizycznej

Po obliczeniu współczynników a i b można w łatwy sposób przewidywać wartość jednej zmiennej znając wartość drugiej zmiennej. Przykładowo, po pomiarze absorpcji A stężenie analitu c można policzyć ze wzoru:

$$c = \frac{A - b}{a} \quad (11)$$

Wykres 2 poniżej przedstawia zmierzoną zależność absorbancji od stężenia białka z dopasowanym równaniem regresji liniowej.



Wykres 2) Zależność absorbancji od stężenia białka. Dodano linię równania regresji liniowej (tzw. linia trendu) wraz z obliczonymi współczynnikami równania liniowego i współczynnikiem determinacji R^2 .

Ocena jakości krzywej kalibracyjnej

Ostatnim etapem kalibracji metody jest ocena jakości przygotowanej krzywej. Istnieje kilka różnych parametrów oceny przygotowanej krzywej kalibracyjnej. W idealnym przypadku wyznaczone eksperymentalnie punkty na wykresie krzywej kalibracyjnej powinny być położone na linii wyznaczonej równaniem regresji. Jednakże w wyniku błędów popełnianych podczas sporządzania krzywej kalibracyjnej często wyznaczone punkty na krzywej odstają w mniejszym lub większym stopniu od równania regresji. Im większe odstępstwa tym większy błąd jest popełniany przy odczytywaniu wartości jednej zmiennej (np. stężenia białka) na podstawie wartości drugiej zmiennej (np. absorbancji). W przypadku regresji liniowej istnieje kilka sposobów na sprawdzenie jakości sporządzonej krzywej kalibracyjnej.

Jednym z parametrów opisujących jakość krzywej kalibracyjnej dla regresji liniowej jest współczynnik determinacji R^2 . Współczynnik ten jest kwadratem współczynnika korelacji liniowej R liczonego ze wzoru:

$$R = \frac{n \sum_{i=1}^n (x_i \cdot y_i) - (\sum_{i=1}^n x_i) \cdot (\sum_{i=1}^n y_i)}{\sqrt{(n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2) (n \sum_{i=1}^n y_i^2 - (\sum_{i=1}^n y_i)^2)}} \quad (12)$$

Współczynnik korelacji liniowej R , w jakim stopniu wartości dwóch cech lub wielkości fizycznych są ze sobą zależne w sposób liniowy. Zawiera się on w przedziale $(-1;1)$, przy czym wartość 0 oznacza całkowity brak zależności, wartość 1 oznacza pełną zależność prostą, a wartość -1 oznacza zależność odwrotną (korelację ujemną lub antykorelację).

Współczynnik determinacji wyrażony w procentach jest miarą dopasowania danych eksperymentalnych do modelu regresji liniowej. Jego wartość określa, jaka część zmienności jednej zmiennej (np. absorbancji) może być wyjaśniona zmiennością drugiej zmiennej (np. stężenia analitu).

Przykładowo, wartość $R^2 = 0,99$ oznacza, że 99% zmienności jednej zmiennej może być wyjaśnione zmiennością drugiej zmiennej. 1% to wpływ innych czynników. W tym przypadku będą to głównie błędy popełnione podczas sporządzania krzywej kalibracyjnej. Dla dobrej jakości krzywej wartość R^2 powinna wynosić przynajmniej 0,999.

Innym parametrem określającym jakość krzywej kalibracyjnej jest odchylenie reszkowe (nazywane również średnim odchyleniem od prostej), które miarą niepewności wyników w krzywej wzorcowej. Średnie odchylenie jest tym większe im większa jest odległość eksperymentalnie wyznaczonych punktów na wykresie od punktów teoretycznych wyznaczonych przez równanie regresji liniowej. Oblicza się je ze wzoru:

$$s_0 = \sqrt{\frac{1}{n-2} (\sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2)} \quad \text{gdzie } \varepsilon_i = y_i - ax_i - b \quad (13)$$

Im większa wartość średniego odchylenia od prostej tym gorsza jakość sporządzonej krzywej kalibracyjnej. Stosowanie średniego odchylenia od prostej do szacowania jakości krzywej wzorcowej jest dużo mniej intuicyjne i jest ono używane w głównej mierze do obliczania niepewności (błędów) współczynników a i b równania liniowego:

$$s_a = s_0 \cdot \sqrt{\frac{n}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}} \quad s_b = s_0 \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}} \quad (14)$$

Wartości s_a i s_b wykorzystuje się do sprawdzenia, czy wartości współczynników a i b istotnie różnią się od zakładanych wartości teoretycznych (jeśli takie istnieją). Najczęściej sprawdza się, czy współczynnik b istotnie różni się od 0.

Błąd przypadkowy dla wartości zmiennej x (tj. stężenia analitu) odczytywanej przy użyciu krzywej kalibracyjnej jest określony wzorem:

$$s = \frac{s_0}{a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_k - y_{sr})^2}{a^2 \cdot (\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot x_{sr}^2)}} \quad (15)$$

gdzie

n – ilość wzorców;

m – ilość pomiarów dla każdego wzorca;

y_{sr} – średnia wartość zmierzonej wielkości fizycznej (np. absorbancji) dla wzorców;

y_{sr} – średnia wartość stężenia wzorców;

y_k – średnia wartość zmierzonej wielkości fizycznej (np. absorbancji) dla badanej próbki.

Ze wzoru (15) wynika, że błąd popełniany przy odczycie stężenia analitu jest:

- proporcjonalny do średniego odchylenia od prostej regresji. Zatem, im dokładniej sporządzona krzywa, tym mniejszy błąd wartości stężenia analitu odczytywanego przy jej wykorzystaniu;
- odwrotnie proporcjonalny do współczynnika a . Zatem, im czulsza metoda, tym dokładniej można zmierzyć stężenie analitu;
- tym mniejszy im więcej wzorców użyto do sporządzenia krzywej kalibracyjnej;
- tym mniejszy im więcej razy była odczytywana wartość wielkości fizycznej (np. absorbancji) dla danego stężenia wzorca.
- błąd odczytywanej wartości stężenia analitu zależy od doboru stężeń wzorcowych. Stężenia wzorcowe powinny być dobrane tak, aby możliwie równomiernie pokrywać dany zakres krzywej wzorcowej;

- przy równomiernie rozłożonych stężeniach wzorcowych najmniejszy błąd odczytu z krzywej kalibracyjnej jest dla wartości y_k leżącej pośrodku krzywej kalibracyjnej. Im wartość mierzonej wartości fizycznej dla badanej próbki jest bliższa jednemu z końców krzywej, tym większy błąd odczytywanej wartości stężenia analitu.

Zestawy ćwiczeń do wykonania

Zestaw 1 (Pipetowanie i analiza statystyczna wyników)

Ćwiczenie 1: Nauka prawidłowego i dokładnego pipetowania

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest nauka prawidłowego korzystania z nastawnej pipety automatycznej.

Potrzebne materiały

- Pipeta automatyczna w zakresie 20-200 μl
- Probówki typu Eppendorf 1,5 ml (ependorfki)
- Końcówki do pipet
- Roztwory barwników: 0,25% Oranż G, 0,25% błękit bromofenolowy oraz 0,25% ksylencyjanol

Wykonanie

Do 5 ependrofeek odpipetować następujące ilości poszczególnych barwników

Ependorfka	Oranż G (μl)	Błękit bromofenolowy (μl)	Ksylencyjanol (μl)
1	20	100	30
2	50	40	60
3	50	100	
4	90		60
5	80	70	

W każdej ependorfce powinno być 150 μl cieczy. Ustaw pipetę na taką objętość i pobierz zawartość ependorfki. Sprawdź, czy w ependorfce pozostała ciecz, czy też jej zabrakło (w końcówce pipety pojawił się bąbel powietrza). Swoje obserwacje skonsultuj z prowadzącym ćwiczenia. W przypadku dużych błędów w pipetowaniu powtórz ćwiczenie.

Ćwiczenie 2. Sprawdzanie kalibracji pipety automatycznej.

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest zapoznanie się ze sposobem sprawdzania kalibracji pipety nastawnej.

Potrzebne materiały

- Pipeta automatyczna w zakresie 100-1000 μl
- Końcówki do pipet
- Woda
- Naczynie wagowe
- Waga

Wykonanie

- 1) Ustaw pipetę na 100 μl .
- 2) Dziesięć razy dozuj wodę destylowaną do zlewki umieszczonej na wadze za każdym razem zapisując masę wody.
- 3) Powtórz to samo dla objętości 500 μl i 1000 μl .

Opracowanie wyników

- 1) Przelicz masę wody na jej objętość (gęstość wody w temp 20°C wynosi 0,9982 g/cm³).
- 2) Dla każdej serii danych zastosuj test Q-Dixona, aby wyeliminować ewentualne błędy grube.
- 3) Dla każdego zakresu oblicz:
 - Maksymalny rozrzut
 - Średnią;
 - Odchylenie standardowe (niepewność pojedynczego pomiaru) i błąd standardowy (niepewność średniej 10 pomiarów);
 - Testem t-Studenta sprawdź, czy uzyskane średnie istotnie różnią się od wartości oczekiwanych (ustawionych wartości pipety).
- 4) Porównaj uzyskane wyniki (maksymalny rozrzut, średnia i odchylenie standardowe) z wynikami uzyskanymi przez inne grupy i wyciągnij wnioski.

Ćwiczenie 3. Pomiar gęstości roztworu sacharozy.

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest nauka pipetowania roztworów o dużej gęstości.

Potrzebne materiały

- Pipeta automatyczna w zakresie 100-1000 µl
- Końcówki do pipet
- Woda
- Sacharoza
- Naczynie wagowe
- Waga
- Mieszadło magnetyczne

Wykonanie

- 1) Sporządź 50 g 40% roztworu sacharozy.
- 2) Ustaw pipetę na 1000 µl.
- 3) Dziesięć razy dozuj roztwór sacharozy do zlewki umieszczonej na wadze za każdym razem zapisując masę roztworu. Do dozowania zastosuj pipetowanie odwrotne. Pamiętaj, aby przez dozowaniem wytrzeć z zewnątrz końcówkę pipety.

Opracowanie wyników

- 1) Dla każdego wyniku oblicz gęstość roztworu sacharozy.
- 2) Zastosuj test Q-Dixona, aby wyeliminować ewentualne błędy grube.
- 3) Oblicz:
 - Średnią gęstość;
 - Odchylenie standardowe (niepewność pojedynczego wyniku) i błąd standardowy (niepewność średniej 10 pomiarów);
 - Testem t-Studenta sprawdź, czy uzyskana średnia wartość istotnie różni się od wartości oczekiwanej (gęstość 40% roztworu sacharozy w 20°C wynosi 1176,48 kg/m³).
- 4) Porównaj uzyskane wyniki (średnia i odchylenie standardowe) z wynikami uzyskanymi przez inne grupy i wyciągnij wnioski.

Ćwiczenie 4. Oznaczanie zawartości cukrów redukujących w miodzie

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest sporządzenie krzywej kalibracyjnej, określenie jej jakości i zastosowanie jej do oznaczania stężenia określonego związku w badanym roztworze.

Potrzebne materiały

- Pipety automatyczne w zakresie 100-1000 μl i 1-5 ml
- Końcówki do pipet
- Woda dejonizowana
- Miód
- 10 mM glukoza
- 1% [w/v] roztwór kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) w 0,4 M NaOH
- Naczynie wagowe
- Waga
- Mieszadło magnetyczne
- Próbówki szklane
- Cylindry miarowe
- Zlewki
- Spektrofotometr

Wykonanie

Przygotowanie wstępne

- 1) Używając roztworu 10 mM glukozy i wody dejonizowanej sporządź po 5 ml roztworów glukozy o stężeniu 1 mM, 2,5 mM, 5 mM i 7,5 mM.
- 2) Do zlewki odważ ok 1 g miodu (zapisz dokładną masę naważki), a następnie dodaj 100 ml wody dejonizowanej mieszaj aż do całkowitego rozpuszczenia się miodu.
- 3) Następnie przygotuj po 5 ml roztworu miodu 10x i 100x rozcieńczonego wykorzystując do tego **metodę seryjnych rozcieńczeń**.

Sporządzanie krzywej kalibracyjnej

- 1) Przygotuj 6 czystych probówek szklanych, a następnie odmierz do nich roztwory wzorcowe według poniższej tabeli.

Próbówki	Roztwór i jego ilość		
	2 ml	4 ml	1 ml
1	Woda dejonizowana (próba odniesienia)	Woda dejonizowana	1% DNS
2	1 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS
3	2,5 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS
4	5 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS
5	7,5 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS
6	10 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS

- 2) Zawartość probówek dokładnie wymieszaj i wstaw na 15 minut do bloku grzejnego ustawionego na 100°C.
- 3) Próbówki schłódź i odczytaj absorbancję przy długości fali 550 nm. Jako próby odniesienia użyj probówek, w której była woda dejonizowana. Wykonaj trzy **niezależne** pomiary absorbancji dla każdego stężenia glukozy.

Oznaczanie stężenia cukrów redukujących w roztworze miodu

- 1) Przygotuj 4 probówki szklane. Do trzech z nich odmierz po 2 ml (1) przygotowanego roztworu miodu, (2) roztworu miodu 10-krotnie rozcieńczonego i (3) roztworu miodu 100-krotnie rozcieńczonego. Do czwartej probówki dodaj 2 ml wody dejonizowanej.
- 2) Następnie do każdej probówki dodaj 4 ml wody dejonizowanej i 1 ml roztworu 1% DNS.
- 3) Zawartość probówek dokładnie wymieszaj i wstaw na 15 minut do bloku grzejnego ustawionego na 100°C.
- 4) Probówki schłódź i odczytaj absorbancję przy długości fali 550 nm. Jako próby odniesienia użyj probówki, w której była woda dejonizowana. Dla każdego roztworu miodu wykonaj trzy **niezależne** pomiary absorbancji.

Opracowanie wyników

- 1) Policz średnią absorbancję dla każdego stężenia glukozy i sporządź wykres zależności absorbancji od stężenia glukozy.
- 2) Stosując metodę najmniejszych kwadratów wyznacz współczynniki regresji liniowej ($Y = aX + b$).
- 3) Oceń jakość sporządzonej krzywej wyznaczając współczynnik determinacji r^2 .
- 4) Porównaj uzyskane wartości współczynnika determinacji r^2 z wartościami uzyskanymi przez inne grupy.
- 5) Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji oraz wyznaczonej krzywej kalibracyjnej wyznacz stężenie cukrów redukujących w przygotowanym roztworze miodu. Obliczenia wykonaj dla jednego z trzech roztworów miodu. Wybierz roztwór, dla którego zmierzona absorbancja, najlepiej pasuje do sporządzonej krzywej kalibracyjnej.
- 6) Oblicz ilość cukrów redukujących w miodzie (w mmolach na gram miodu).

Literatura:

Szczepaniak W. „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, Rozdziały 1, 2 i 3.

Zestaw 2 (Fracjonowanie komórki)

Ćwiczenie 1: Izolacja chloroplastów

Cel ćwiczenia: *Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z podstawowymi metodami frakcjonowania komórki przy użyciu homogenizacji, wirowania oraz wirowania w gradiencie sacharozy. Podczas ćwiczenia studenci wyizolują chloroplasty z liści groszku i sprawdzą ich aktywność.*

Potrzebne materiały

- Pipety automatyczne
- Pipety pasterowskie
- Zlewki
- Cylindry miarowe
- Lejek
- Bibuła filtracyjna
- Kuwety szklane lub kwarcowe
- Mieszadła magnetyczne
- Końcówki do pipet

- Sacharoza
- Dwutygodniowe siewki groszku.
- Sacharoza
- Sorbitol
- 1 M Tris-HCl, pH 8,0
- 0,5 M EDTA, pH 8,0
- 80% aceton
- BSA

Wykonanie

Sporządzanie roztworów

Bufor do homogenizacji (250 ml)

Do 200 ml dejonizowanej wody dodaj:

0,35 M Sorbitol	15,95 g
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	12,5 ml 1 M Tris-HCl
5 mM EDTA	2,5 ml 0,5 M EDTA
0.1% BSA	250 mg

Po rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnij dejonizowaną wodą do 250 ml. Przed użyciem dodaj 250 µl β-merkaptotetanolu.

Bufor do płukania (150 ml)

Do 80 ml dejonizowanej wody dodaj:

0,35 M Sorbitol	9,57 g
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	7,5 ml 1 M Tris-HCl
2,5 mM EDTA	0,75 ml 0,5 M EDTA

Po rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnij wodą do 150 ml.

52% roztwór sacharozy (100 ml)

Do 50 ml dejonizowanej wody dodaj:

Sacharoza	52 g
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	5 ml 1 M Tris-HCl
2,5 mM EDTA	0,5 ml 0,5 M EDTA

Po rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnij wodą do 100 ml. W przypadku niecałkowitego rozpuszczenia sacharozy zlewkę lekko podgrzej.

30% roztwór sacharozy (100 ml)

Do 50 ml dejonizowanej wody dodaj:

Sacharoza	30 g
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	5 ml 1 M Tris-HCl
2,5 mM EDTA	0,5 ml 0,5 M EDTA

Po rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnij wodą do 100 ml.

Wszystkie roztwory po sporządzeniu należy schłodzić w lodzie.

Przygotowanie gradientu sacharozy

Do próbówki wirówkowej 28 ml nanieś na dno 10 ml 52% roztworu sacharozy. Następnie ostrożnie nanieś 10 ml 30% roztworu sacharozy. Przygotowane gradienty trzymaj w lodzie do czasu ich użycia.

Preparacja chloroplastów

- 1) Z siewek grochu zbierz 50 g młodych zdrowych liści.
- 2) Liście umieść w schłodzonym homogenizatorze.
- 3) Dodaj 250 ml buforu do homogenizacji i homogenizuj 30s.
- 4) Homogenizat przefiltruj przez tetrową pieluchę.
- 5) Homogenizat przenieś do czterech probówek wirówkowych 60 ml.
- 6) Wiruj przez 5 minut przy 1000g w 4°C.
- 7) Zlej supernatant, a osad delikatnie zawieś pędzelkiem w 5 ml buforu do płukania.
- 8) Zawiesinę ostrożnie nanieś na przygotowany gradient sacharozy.
- 9) Wiruj przez 45 minut przy 5500g w 4°C w rotorze horyzontalnym.
- 10) Przyjrzyj się rozmieszczeniu zielonych prążków na uzyskanym gradiencie. Używając pipetki pasterowskiej delikatnie zbierz chloroplasty z granicy faz 52%/30% i przenieś do nowej probówki wirówkowej.
- 11) Dodaj 15 ml buforu płuczącego. Zawartość probówki delikatnie wymieszaj i wiruj przez 15 minut przy 1500g w 4°C.
- 12) Ostrożnie usuń supernatant.
- 13) Preparat zawieś w 0,5 ml wody destylowanej.

Wyznaczanie widma chlorofilu

- 1) Do probówki wlej 6 ml 80% acetonu i zawieś w nim 30 μ l uzyskanego preparatu chloroplastów.
- 2) Po 5 minutach inkubacji zawartość probówki przefiltruj przez krążek z bibuły filtracyjnej.
- 3) Zmierz widmo przygotowanego preparatu w zakresie światła widzialnego.

Opracowanie wyników

- 1) Narysuj schemat gradientu sacharozy po wirowaniu. Opisz, jakie składniki komórki znajdują się na poszczególnych poziomach gradientu.
- 2) Narysuj widmo chlorofilu i podaj długości fal, przy których występują maksima absorpcji.
- 3) Napisz, Jaką rolę pełnią poszczególne składniki buforów i roztworów używanych podczas preparacji chloroplastów.
- 4) Napisz, jakie procesy zachodzą w kolejnych etapach preparacji chloroplastów.

Literatura:

Jóźwiak Z, Bartosz G. „Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005, Rozdział 10

Zestaw 3 (Miareczkowanie pH-metryczne)

Ćwiczenie 1: Miareczkowanie potencjometryczne aminokwasów

Cel ćwiczenia: *Celem ćwiczenia jest eksperymentalne wyznaczenie metodą graficzną pI aminokwasu oraz stałej dysocjacji (pK) jego grupy aminowej oraz grupy bocznej.*

Potrzebne materiały

- Biureta automatyczna
- pH-metr
- elektroda szklana zespolona
- Zlewka 100 ml
- Cylindry miarowe

- Mieszadło magnetyczne
- 50 mM roztwór histydyny
- 1 M HCl
- 0,2 M NaOH

Wykonanie

- 1) Biuretę automatyczną napełnij roztworem 0,2 M NaOH.
- 2) Do zlewki wlej 20 ml 50 mM roztworu histydyny.
- 3) Zlewkę umieść na mieszadle magnetycznym, a w roztworze zanurz elektrodę pH-metru.
- 4) Za pomocą 1 M HCl doprowadź pH roztworu do wartości ok. 2.
- 5) Za pomocą biurety automatycznej dodawaj po 0,1 ml 0,2 M NaOH. Po ustabilizowaniu się wskazania pH-metru odczytaj i zapisz wartość pH. Miareczkowanie kontynuuj do uzyskania pH o wartości ok. 12.

Opracowanie wyników

- 1) Uzyskane wyniki pomiarów umieść w tabeli:

nr	0,2 M NaOH [ml]	wartość pH
1	0	~2,00
2	0,1	...
...	...	...
n	...	~12

- 2) Na papierze milimetrowym sporządź wykres zależności pH (oś *y*) od objętości dodanego NaOH (oś *x*).
- 3) W oparciu o wykonany wykres wyznacz metodą graficzną wartości: pI; pK grupy α -aminowej oraz pK grupy bocznej histydyny.
- 4) Porównaj uzyskane wartości z wartościami teoretycznymi.
- 5) Napisz równanie dysocjacji histydyny.

Ćwiczenie 2: Wyznaczanie pojemności buforowej buforu octanowego.

Cel ćwiczenia: *Celem ćwiczenia jest eksperymentalne wyznaczenie metodą graficzną maksymalnej wartości buforowej buforu octowego i stałej dysocjacji pK kwasu octowego.*

Potrzebne materiały

- Biureta automatyczna
- pH-metr
- Elektroda szklana zespolona
- Zlewka 100 ml
- Cylindry miarowe
- Mieszadło magnetyczne
- 50 mM kwas octowy
- 0,2 M NaOH

Wykonanie

- 1) Biuretę automatyczną napełnij roztworem 0,2 M NaOH.
- 2) Do zlewki wlej 20 ml 50 mM roztworu kwasu octowego.
- 3) Zlewkę umieść na mieszadle magnetycznym, a w roztworze zanurz elektrodę pH-metru.
- 4) Odczytaj wartość pH. Za pomocą biurety automatycznej dodawaj po 0,5 ml 0,2 M NaOH. Po ustabilizowaniu się wskazania pH-metru odczytaj i zapisz wartość pH. Miareczkowanie kontynuuj do uzyskania pH o wartości ok. 9.

Opracowanie wyników

- 1) Dla każdej wartości pH oblicz pojemność buforową. Uzyskane wyniki pomiarów umieść w tabeli:

nr	pH	pojemność buforowa (β)
1	...	...
2	...	...
...	...	...
n	~9	...

- 2) Sporządź wykres zależności pojemności buforowej β (oś y) od wartości pH (oś x).
- 3) W oparciu o wykonany wykres wyznacz metodą graficzną wartość pK grupy kwasu octowego oraz maksymalną pojemność buforową buforu octanowego (podaj jego stężenie).
- 4) Porównaj uzyskane wartości z wartościami teoretycznymi.

Ćwiczenie 3: Charakterystyka elektrody szklanej.

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest wyznaczenie zależności siły elektromotorycznej (SEM) od wartości pH dla elektrody szklanej zespolonej, znalezienia współczynnika proporcjonalności k i porównanie go z wartością teoretyczną.

Potrzebne materiały

- Pipeta automatyczna
- pH-metr
- Elektroda szklana zespolona
- Zlewki 100 ml (1 sztuka)
- Cylindry miarowe
- Mieszadło magnetyczne
- 1 M kwas octowy CH_3COOH
- 1 M kwas fosforowy H_3PO_4
- 0,2 M kwas borowy H_3BO_3
- 0,2 M NaOH

Wykonanie

- 1) W zlewce 100 ml przygotuj 50 ml roztworu według Brittona-Robinsona (0,04 M CH_3COOH , 0,04 M H_3PO_4 , 0,04 M H_3BO_3);
- 2) Zlewkę umieść na mieszadle magnetycznym, a w roztworze zanurz elektrodę pH-metru.
- 3) pH-metr przełącz w tryb pomiarów potencjometrycznych [mV].
- 4) Do zlewki dodawaj 0,2 M NaOH w porcjach po 5 ml. Po każdej dodanej porcji odczytaj i zapisz wartość SEM. Po dodaniu porcji NaOH należy poczekać na ustabilizowanie się wskazań elektrody. Pomiar przerwij po dodaniu 8 porcji (łącznie 40 ml) 0,2 M NaOH).

Opracowanie wyników

- 1) Sporządź wykres zależności SEM (oś y) od pH (oś x). Wartości pH dla kolejnych porcji 0,2 M przedstawia poniższa tabela.

L.p.	Objętość 0,2 M NaOH	pH
1	5 ml	2,21
2	10 ml	3,29
3	15 ml	4,56

4	20 ml	5,72
5	25 ml	6,80
6	30 ml	7,96
7	35 ml	9,15
8	40 ml	10,38

- 2) Dla obszaru, w którym zależność jest liniowa wyznacz współczynniki regresji liniowej ($Y = aX + b$). Współczynnik a jest poszukiwanym molowym współczynnikiem proporcjonalności.
- 3) Porównaj obliczony współczynnik proporcjonalności z wartością teoretyczną ($k = 2,303 RT/nF$ dla 25°C ma wartość 59,1 mV). Uzyskany wynik wyraż w % wartości teoretycznej.

Literatura:

Zgirski A, Gondko R. „Obliczenia biochemiczne”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998, Rozdział 4.

Szczepaniak W. „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, Rozdział 9.

Zestaw 4 (Spektrometria)

Ćwiczenie 1: Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest eksperymentalne wyznaczenie molowego współczynnika absorpcji przy wykorzystaniu prawa Lamberta-Beera.

Potrzebne materiały

- Spektrofotometr
- Kuwety
- Pipety automatyczne
- Końcówki do pipet
- Probówki szklane
- Tryskawka
- DCIP

Wykonanie

- 1) Przygotuj 200 ml 100 μ M DCIP (m.c.z. DCIP wynosi 268,10 g/mol). Ilość roztworu jest wystarczająca dla całej grupy
- 2) Przygotuj 10 probówek szklanych i sporządź w nich po 10 ml roztworów DCIP o różnym stężeniu posługując się poniższą tabelą:

Nr probówki	100 μ M DCIP [ml]	Woda dejonizowana [ml]
0	0,00	10,00
1	0,25	9,75
2	0,50	9,50
3	0,75	9,25
4	1,00	9,00
5	1,25	8,75
6	1,50	8,50
7	1,75	8,25
8	2,00	8,00

9	2,50	7,50
---	------	------

- 3) Zmierz absorbancję przygotowanych roztworów DCIP przy długości fali 600 nm stosując probówkę nr 0 jako próbę odniesienia. Pomiary zacznij od najniższych stężeń do najwyższych. Dla każdego stężenia wykonaj po trzy pomiary. Po każdej zmianie stężenia kuwetę opłucz wodą dejonizowaną i dokładnie osusz.

Opracowanie wyników

- 4) Policz średnią absorbancję dla każdego stężenia DCIP i sporządź wykres zależności absorbancji od stężenia DCIP.
- 5) Stosując metodę najmniejszych kwadratów wyznacz współczynniki regresji liniowej ($Y = aX + b$). Współczynnik a jest poszukiwanym molowym współczynnikiem absorpcji ϵ .
- 6) Oceń jakość sporządzonej krzywej wyznaczając współczynnik korelacji liniowej Pearsona r .
- 7) Porównaj uzyskane wartości ϵ i r z wartościami uzyskanymi przez inne grupy.

Ćwiczenie 2: Wpływ pH na własności spektralne związków chemicznych

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest pokazanie na przykładzie błękitu bromofenolowego, że właściwości spektralne związków chemicznych zależą od pH. Podczas eksperymentu studenci będą obserwować, w jaki sposób barwa błękitu bromofenolowego zależy od pH roztworu i zbadają widmo absorpcyjne tego związku przy dwóch różnych wartościach pH.

Potrzebne materiały

- Spektrofotometr
- Kuwety
- Pipety automatyczne
- Końcówki do pipet
- Probówki szklane
- 0,1% roztwór błękitu bromofenolowego
- kwas cytrynowy (m.cz. wynosi 192,12 g/mol)
- wodorofosforan disodu Na_2HPO_4 (m.cz. wynosi 141,96 g/mol)

Wykonanie

- 1) Przygotuj 50 ml 0,1 M kwasu cytrynowego i 50 ml 0,2 M Na_2HPO_4 (każda podgrupa przygotowuje własny roztwór). W 40 ml należy rozpuścić odpowiednią ilość kwasu cytrynowego lub Na_2HPO_4 i uzupełnić do 50 ml.
- 2) Przygotuj 9 probówek szklanych i sporządź w nich po 5 ml buforu cytrynianowo-fosforanowego o różnych wartościach pH posługując się poniższą tabelą:

pH	0,1 M kwas cytrynowy [ml]	0,2 M Na_2HPO_4 [ml]
2,6	4,45	0,55
3,2	3,75	1,25
3,8	3,20	1,80
4,4	2,80	2,20
5,0	2,40	2,60
5,6	2,10	2,90
6,2	1,70	3,30
6,8	1,15	3,85
7,4	0,45	4,55

- 3) Do każdej probówki dodaj po 50 μl 0,1% roztworu błękitu bromofenolowego i zawartość probówki wymieszaj.
- 4) Zaobserwuj, jaki kolor przybrał błękit bromofenolowy w probówkach o różnych wartościach pH.
- 5) Przygotuj 4 kuwety. Do pierwszej wlej 1,5 ml wody, do drugiej 1,5 ml roztworu z probówki o pH 2,6 (kolor żółty), do trzeciej 1,5 ml roztworu z probówki o pH 7,4 (kolor fioletowy), a do czwartej roztworu z probówki o kolorze przejściowym (zanotuj pH).
- 6) Ustaw spektrofotometr na długość fali $\lambda=400\text{ nm}$ i wyzeruj go względem kuwety z wodą. Zmierz i zanotuj absorbancję kuwet nr 2 i 3. Pomiary absorbancji powtarzaj zmniejszając za każdym razem długość fali o 20 nm. Pomiary przerwij przy długości fali $\lambda=700\text{ nm}$.

Opracowanie wyników

- 1) Sporządź wykresy zależności absorbancji A (oś y) od długości fali λ (oś x) dla roztworów błękitu bromofenolowego o trzech różnych wartościach pH (dane zebrane w punkcie 6).
- 2) Metodą graficzną wyznacz punkt izobestyczny błękitu bromofenolowego, oraz maksima absorpcji dla jego formy kwasowej i zasadowej.

Ćwiczenie 3: Wpływ stopnia utlenienia na własności spektralne związków chemicznych

Cel ćwiczenia: Celem ćwiczenia jest pokazanie na przykładzie cytochromu c, że właściwości spektralne związków chemicznych zależą od ich stopnia utlenienia. Podczas eksperymentu studenci przygotują roztwór cytochromu c w postaci zredukowanej i utlenionej oraz sprawdzą jak, stopień utlenienia wpływa na widmo absorpcyjne tego białka.

Potrzebne materiały

- Spektrofotometr
- Kuwety
- Pipety automatyczne
- Końcówki do pipet
- Probówki szklane
- Roztwór cytochromu c 0,4 mg/ml
- 0,1 M bufor fosforanowy pH 7,0
- 5 mM roztwór $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
- 10 mM roztwór kwasu askorbinowego

Wykonanie

- 1) Przygotuj 3 czyste probówki szklane, a następnie odmierz do nich roztwory według poniższej tabeli:

Próbówka	Roztwór i jego ilość		
	1 ml	1 ml	0,1 ml
1	bufor fosforanowy	Roztwór cytochromu c	woda dejonizowana
2	bufor fosforanowy	Roztwór cytochromu c	roztwór $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
3	bufor fosforanowy	Roztwór cytochromu c	roztwór kwasu askorbinowego

- 2) Odczekaj 10 minut i porównaj kolory każdej z probówek.
- 3) Zawartość probówek przenieś do kuwet i zmierz widma w zakresie 390-610 nm.

Opracowanie wyników

- 1) Na podstawie sporządzonych widm absorpcji wyznacz maksima absorpcji dla formy utlenionej i zredukowanej cytochromu c.
- 2) Porównaj wszystkie 3 uzyskane widma absorpcyjnej i zastanów się, czy przygotowany wyjściowy roztwór cytochromu c w większym stopniu składa się z formy utlenionej, czy zredukowanej.

Literatura:

Szczepaniak W. „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, Rozdział 6.1.