

Vážení, odměřování objemů

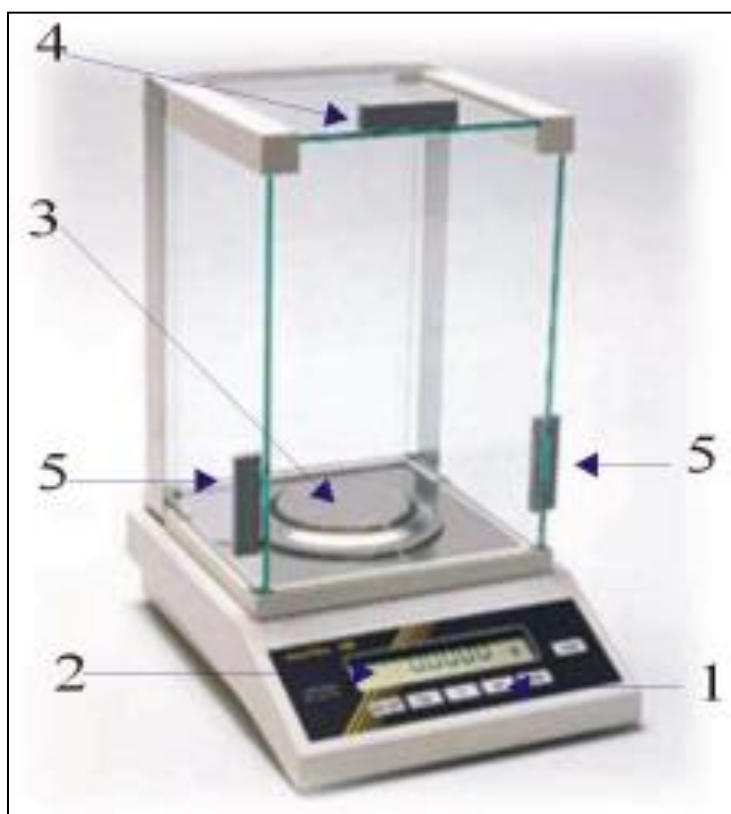
Vážení

K nezbytnému vybavení každé laboratoře patří váhy, pomocí kterých určujeme množství dané látky. Princip vážení je znám po staletí. Jde o srovnávací metodu, kdy se srovnává neznámá hmotnost vzorku se známou hmotností standardu – závaží. Známé miskové váhy využívaly principu docílené rovnováhy na páce. Dlouhou dobu bylo této sestavy využíváno i u nejpřesnějších analytických vah.

V dnešní době se již dvoumiskové váhy nevyužívají a v laboratořích jsou běžně používány váhy elektronické. Existují dva rozdílné typy vah lišící se váživostí, tedy maximální hmotností, kterou můžeme vážit, a přesností, se kterou na nich můžeme hmotnost stanovit.

Váhy technické mají podle provedení váživost od 100 g do několika kilogramů s přesností, která nebývá větší než 0,05 g.

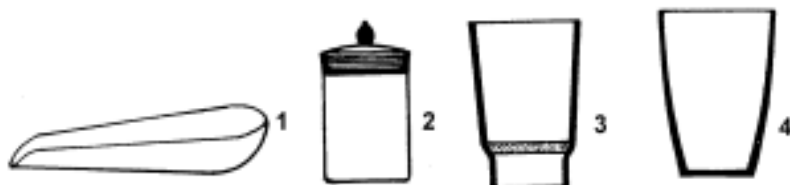
Váhy analytické mívají váživost 100 g s přesností v řádu 0,0001 g.



Obr. 1: Elektronické analytické váhy; 1 – tlačítka, 2 – displej, 3 – miska, 4 – horní posuvná dvířka, 5 – boční posuvná dvířka

K orientačnímu zjištění hmotnosti předmětů či chemikálií se využívá tzv. předvážek, které mají váživost do 200 g s přesností 0,1 g.

Před začátkem vážení na analytických vahách (obr. 1) musí být okolí i vnitřek vah čistý. Případné nečistoty opatrně odstraníme vlasovým štětcem. Nádobka použitá k vážení (obr. 2) musí mít potřebnou velikost a hmotnost vzhledem k váženému vzorku. Posunem jedné boční stěny otevřeme vnitřní prostor vah a vzorek v přiměřené nádobce (např. lodičce) vložíme na misku. Vzorek přidáváme či ubíráme kopistí (nejčastěji nerezová plochá lžička; obr. 3).



Obr. 2: **Nádobky na vážení**; 1 – lodička, 2 – odvažovačka s víčkem, 3 – skleněný kelímek, 4 – porcelánový žíhací kelímek

Není-li to nutné, manipulujeme se vzorkem raději mimo prostor vah, aby se navažovaná látka nerozsypala v prostoru vah. Malá množství látky odebraná z lodičky se už nikdy nevrací zpět do zásobní láhve. Před konečným odečtením hmotnosti váhy nejprve zavřeme a počkáme na ustálení hodnoty hmotnosti na displeji vah. Zapišeme si hmotnost. Navážený vzorek po vyjmutí z vah ihned, ještě ve váhově, opatrně přesypeme do připravené nádoby a zjistíme hmotnost prázdné lodičky. Hmotnostní rozdíl plné a prázdné lodičky odpovídá hmotnosti vzorku k rozboru. Tento způsob vážení se označuje jako diferenční. U přímého vážení je nutné nejdříve přesně zjistit hmotnost táry, tj. čisté navažovací nádoby a pak teprve zvážit nádobku se vzorkem. Analytické váhy jsou určeny k přesnému vážení s přesností na desítky miligramů. Ve všech ostatních případech se používají technické váhy neboli předvážky.



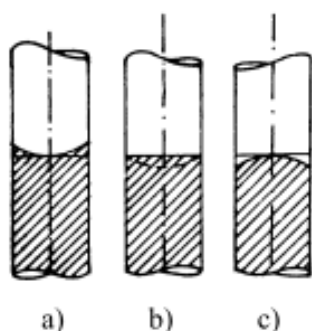
Obr. 3: **Kopist** 1 – kovová dvojitá, 2 – kovová jednostranná, 3 – skleněná

Odměrování objemů

K odměrování objemů kapalin používáme kalibrované nádoby, jako jsou odměrné válce, pipety, byrety, pykometry a odměrné baňky. Jednotlivé druhy tohoto nádobí umožňují jednak přípravu roztoků analyzovaných látek a činidel o přesné koncentraci (odměrné baňky), přesné oddělování podílů roztoků (pipety) a přesné odměrování spotřeby roztoků při titraci (byrety). K přibližnému odměrování kapalin se používají odměrné válce. Kádinky nejsou kalibrovány a nelze je považovat za odměrné nádoby.

Kalibrované nádoby je kalibrováno buď na dolití, nebo na vylití. Odměrné baňky a odměrné válce, sloužící k vymezení objemu kapaliny uvnitř nádoby, jsou kalibrovány na dolití, což je na nádobě vyznačeno zkratkou „IN“. Naopak pipety a byrety, u nichž potřebujeme znát přesný objem vypuštěné kapaliny, jsou kalibrovány na vylití, jejich skutečný vnitřní objem je tedy větší o množství kapaliny ulpělé na stěnách po vypuštění. Kalibrace na vylití je na nádobách vyznačena zkratkou „EX“.

Důležitou zásadou, kterou je zapotřebí přísně dodržovat při správném používání všech druhů odměrného nádobí, je způsob nastavení a odečítání hladiny kapaliny na rysce nebo stupnici vyznačující objem, tzv. způsob čtení (obr. 4). Kapaliny smáčejíci povrch skla (např. vodné nebo alkoholové roztoky) vytvářejí konkávní meniskus, kapaliny nesmáčejíci povrch skla (např. některá organická rozpouštědla) vytvářejí konvexní meniskus. Přesně kalibrované odměrné nádoby má rysku umístěnu pokud možno v zúžené části, kde lépe vyniká tvar menisku a také malá změna v objemu zde způsobí výraznější změnu výšky hladiny. Základem pro čtení objemu u konkávního menisku je jeho spodní okraj, který je u průhledných kapalin, jakými je většina používaných vodných roztoků, dobře viditelný. Objem kapaliny v těchto případech odečítáme v nejnižším bodu menisku. Tohoto způsobu čtení také používá výrobce při kalibraci odměrného nádobí. U neprůhledných kapalin (např. u roztoků manganistanu draselného, jodu apod.), kde spodní okraj menisku není zřetelný, odečítáme podle horního okraje menisku. Nesmáčí-li kapalina povrch skla, čte se podle nejvyššího bodu konvexního menisku.



Obr. 4: Způsoby odečítání hladiny na rysce

- a) u průhledných kapalin s konkávním meniskem
- b) u neprůhledných kapalin s konkávním meniskem
- c) u kapalin s konvexním meniskem

Pipety jsou využívány k přesnému odměrování alikvotních (poměrných) podílů zásobních roztoků. Jde o skleněné nebo polypropylenové trubice s válcovitě rozšířenou střední částí. Mohou být opatřeny jedinou ryskou vymežující jmenovitý objem, nebo více ryskami, vymežující dílčí objemy.

Při práci s pipetami je třeba dbát na jejich správné plnění, to znamená, že ústí pipety musí být stále ponořeno pod hladinou pipetovaného roztoku, aby nedošlo k nasátí vzduchu do pipety. Pro nasávání kapaliny sérologickými pipetami se v laboratoři používají automatické či mechanické nástavce nebo pryžové balonky. NIKDY nepipetujeme kapaliny ústy. Sérologické pipety jsou využívány především v buněčných laboratořích.

V molekulárně-biologických a biochemických laboratořích se v dnešní době pracuje v mikroobjemech a proto jsou ve většině případů používány automatické mikropipety. Tyto pipety umožňují přesnější a pohodlnější odměření daného objemu. Jsou vyráběny pro různé rozsahy objemů (1-5 ml; 100-1000 μ l; 20-200 μ l; 2-20 μ l; 0,5-10 μ l; 0,1-2 μ l). Objem je buď fixní, nebo kontinuálně nastavitelný pomocí otočení šroubu. Nasávání a vypouštění kapaliny přes jednorázovou špičku je ovládáno pístem. Píst má tři polohy: klidovou, pro nasávání a pro vypuštění.

Úloha 1: Určete přesnost odměřování objemu kapaliny pomocí kádinky, odměrného válce a automatických pipet

Pomůcky: kádinka, odměrný válec, automatické pipety vhodného rozsahu, jednorázové špičky, mikrozkuřavky, stojánky, váhy

Chemikálie: voda

Postup:

1. Kádinkou a odměrným válcem odměřte 25 ml vody.
2. Přesnost odměření ověřte na laboratorních předvážkách. Měření 3x zopakujte.
3. Zapněte váhy do elektrické sítě.
4. Vynulujte váhy stisknutím tlačítka TARE (ZERO).
5. Vložte kádinku nebo válec do váhového prostoru.
6. Zaznamenejte zjištěnou hmotnost.
7. Seznamte se s automatickými pipetami a správnou technikou pipetování.
8. Automatickými pipetami odměřte sérii objemů 25; 150 μ l a 500 μ l vody.
9. Přesnost pipetování automatickými pipetami ověřte na laboratorních vahách. Měření pro každý objem 3x zopakujte.
10. Diskutujte zjištěné rozdíly. Který způsob odměřování objemů je nepřesnější?

Centrifugace

Centrifugace slouží k rozdělení částic pomocí odstředivé síly. Často jde o urychlení sedimentace. Zatímco při sedimentaci se částice rozdělují podle své hustoty vlivem gravitačního zrychlení, při centrifugaci na ně působí mnohem větší odstředivé zrychlení. Rozdělení směsi proto probíhá mnohem rychleji.

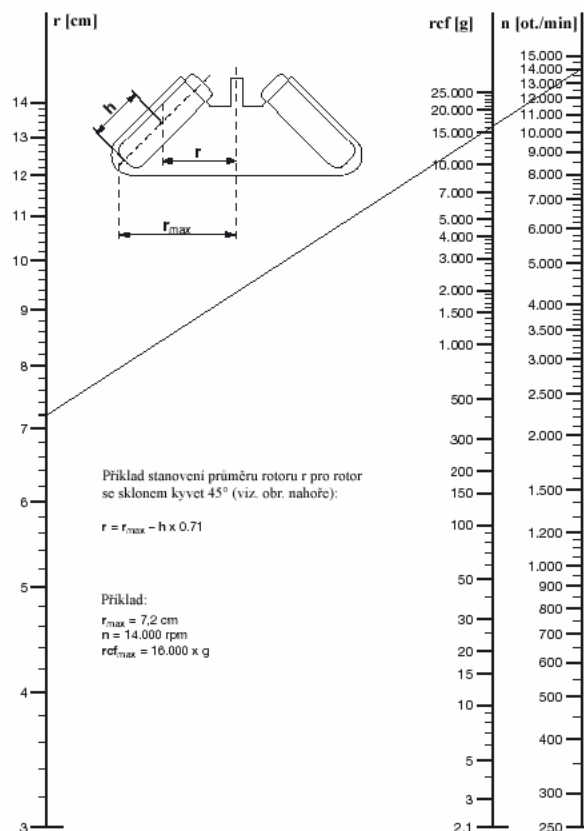
Základní matematické vzorce:

Vztah pro výpočet relativního centrifugačního zrychlení:

$$RCF = 11,18 \times 10^{-6} \times r \times n^2$$

Vztah pro výpočet počtu otáček za minutu pro známou hodnotu RCF: $n = \sqrt{\frac{RCF}{r \times 11,18 \times 10^{-6}}}$

kde n je počet otáček rotoru za minutu, r je vzdálenost místa od středu rotace, závisí na typu centrifugy a RCF je relativní centrifugační zrychlení je číslo bez rozměru – udává kolikrát je zrychlení vyvolané rotací vyšší než gravitační zrychlení Země



Obrázek 1: **Nomogram** pro přepočítání relativní centrifugační síly (rcf) a otáček rotoru za minutu (n) v závislosti na poloměru rotoru (r).

Na částici umístěnou v odstředivém poli působí několik sil. **Odstředivá síla** F_{ods} je úměrná hmotnosti částice m a zrychlení a , které je dáno součinem vzdálenosti částice od středu otáčení r a druhé mocniny úhlové rychlosti otáčejícího se rotoru ω ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$, $\omega=2\pi\cdot\text{rpm}/60$). Platí, že $F_{ods} = m\omega^2 r$. V opačném směru působí na částici **vztlaková síla** F_{vz} , která je podle Archimédova zákona úměrná hmotnosti solventu m_0 vytlačeného sedimentující částicí.

$F_{vz} = -m_0\omega^2 r \Rightarrow m_0 = m\bar{v}\rho = \frac{M}{N}\bar{v}\rho$, kde \bar{v} je **parciální specifický objem** částice ($\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$, definovaný jako změna objemu roztoku v mililitrech, kterou způsobí přidání 1 gramu dané částice do roztoku), a ρ hustota roztoku, ve kterém je částice rozpuštěna.

Poslední silou, která působí na sedimentující částici, je **třecí (frikční) síla** F_f vyvolaná pohybem částice solventu. Frikční síla působí proti směru sedimentace a platí, že $F_f = -f\mathbf{u}$, kde u je pozorovaná radiální rychlost pohybu částice od středu otáčení ke dnu a f translační **frikční koeficient**, který závisí na tvaru a velikosti sedimentující částice (objemné a protáhlé částice mají vyšší hodnoty frikčního koeficientu než malé kulovité částice). Hodnotu frikčního koeficientu pro hladkou kompaktní částici můžeme určit ze Stokesova zákona jako $f_0 = 6\pi\eta R_s$, kde η je viskozita roztoku a R_s Stokesův poloměr, který

lze vypočítat ze vztahu
$$\sqrt[3]{R_s \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_A} \right)}$$

V průběhu centrifugace jsou všechny síly působící na částici v rovnováze ($F_{ods} + F_{vz} + F_f = 0$) a platí, že rychlost sedimentace u je konstantní. Po dosazení příspěvků jednotlivých sil do rovnice popisující jejich celkové působení a následné úpravě dostaneme vztah (jeden z možných zápisů Svedbergovy rovnice), který je definicí **sedimentačního koeficientu** s .

$$\frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Nf} = \frac{u}{\omega^2 r} = s$$

Sedimentační koeficient je definován jako rychlost radiálního pohybu částice v závislosti na aplikovaném odstředivém poli. Sedimentační koeficient je přímo úměrný molekulové hmotnosti částice a nepřímo úměrný jejímu frikčnímu koeficientu. Různé molekuly sedimentují při různých hodnotách s v závislosti na své hmotnosti a tvaru a hodnota sedimentačního koeficientu je tak typická pro sedimentaci určité částice v daném prostředí. Sedimentační koeficient se udává v jednotkách Svedberg (S), které jsou v soustavě SI definovány jako 10^{-13} sekundy. Pro většinu látek nabývají hodnoty s 1-100 S. Pro proteiny jsou většinou charakteristické hodnoty 1 až 10 S (sedimentační koeficient BSA je například 4,3 S), bakteriální ribozom má sedimentační koeficient 70 S.

Hodnota sedimentačního koeficientu závisí na použitých experimentálních podmínkách (teplota, hustota a viskozita pufru). Pro potřeby porovnání výsledků z různých laboratoří/experimentů se sedimentační koeficient extrapoluje ke standardním podmínkám

(20° C, voda) a vyjadřuje jako $s_{20,v}$; tato veličina pak nezávisí na složení solventu a kvantitativně popisuje základní hydrodynamické vlastnosti makromolekuly.

$S_{20,v} = S_{TP} \times \frac{(1-\bar{v}\rho)_{20,v} \times \eta_{T,p}}{(1-\bar{v}\rho)_{T,p} \times \eta_{20,v}}$, kde index v označuje vodné prostředí, p použitý pufr a T je teplota, při jaké byl experiment prováděn.

Pro popis chování částic v průběhu centrifugace je důležitá rovněž **difúze**, jejíž příčinou je náhodný tepelný pohyb částic v roztoku. Pohyb molekul popisuje první Fickův zákon vztahem $J_D = -D \frac{dc}{dr}$, kde J_D je hustota difúzního toku, D translační difúzní koeficient a dc/dr je koncentrační gradient.

Difúzní koeficient D souvisí s frikčním koeficientem f prostřednictvím Stokes-Einsteinovy rovnice: $D = \frac{RT}{N_A f}$, kde R je univerzální plynová konstanta, T termodynamická teplota, N_A Avogadrova konstanta.

METODA SEDIMENTAČNÍ RYCHLOSTI (SV = Sedimentation Velocity)

Metoda sedimentační rychlosti je hydrodynamická technika citlivá jak k hmotnosti, tak i ke tvaru molekul. Při použití dostatečně velké odstředivé síly se částice ve vzorku začínají pohybovat směrem ke dnu cely. Po určité době se tak vytvoří rozhraní mezi oblastí roztoku, kde jsou sedimentující molekuly stále přítomny a oblastí, kde už se nevyskytují, a toto rozhraní se pohybuje v čase směrem ke dnu. Toto chování je typické pro většinu molekul, jako jsou proteiny, DNA, polysacharidy. V případě, že by byla efektivní hustota částic menší, než hustota solventu (např. lipidy, lipoproteiny), částice by se pohybovaly směrem k menisku. Vlivem difúze dochází zároveň k rozmývání rozhraní, což se projevuje změnou jeho tvaru. Z rychlosti pohybu a tvaru rozhraní tak lze vypočítat sedimentační koeficient s a difúzní koeficient D .

Pohyb sedimentačního rozhraní v čase popisuje tzv. Lammova rovnice (parciální diferenciální rovnice). Na jejím řešení jsou založeny všechny pokročilé programy pro analýzu dat získaných metodou sedimentační rychlosti. Pro jednu neinteragující částici nabývá Lammova rovnice tvaru: $\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right] - s\omega^2 \left[r \frac{\partial c}{\partial r} + 2c \right]$, kde c je koncentrace dané látky.

SV experimenty jsou obvykle prováděny při vysoké rychlosti (42000 – 60000 rpm), aby došlo k minimalizaci difúze a zároveň se účinněji odseparovaly částice. Používají se dvousektorové cely se sektory speciálně tvarovanými tak, aby se zabránilo konvekci. Měření trvá obvykle několik hodin.

Metoda sedimentační rychlosti se používá ke stanovení oligomerního stavu makromolekuly, homogenity vzorku, detekci agregátů, odhadu tvaru molekul a detekci jejich konformačních změn za různých podmínek a pro sledování interakcí molekul. Oproti metodě sedimentační rovnováhy je její výhodou výrazně vyšší rozlišení.

METODA SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY (SE = Sedimentation Equilibrium)

Sedimentační rovnováha je termodynamická technika citlivá pouze k hmotnosti částic. Na rozdíl od sedimentační rychlosti, kde se stanovuje sedimentační koeficient, je u sedimentační rovnováhy určována molekulová hmotnost přímo. Měření zde probíhá při nižších rychlostech. S tím, jak látky sedimentují směrem ke dnu, se jejich koncentrace ve spodní části cely zvyšuje a proces difúze začíná působit proti sedimentaci. Po určité době se tyto dva procesy vyrovnají a koncentrace rozpuštěné látky se dále v čase nemění. Exponenciální tvar sedimentačního profilu v rovnováze pro jednu sedimentující částici popisuje následující rovnice:

$c(r) = c(r_0) \exp\left(M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2\left(r^2 - \frac{r_0^2}{2RT}\right)\right)$, kde $c(r)$ je koncentrace látky v radiální vzdálenosti r , $c(r_0)$ koncentrace látky v referenční vzdálenosti r_0 .

Čas potřebný k dosažení rovnováhy závisí na druhé mocnině délky sloupce ve směru odstředivé síly (v případě 3 mm sloupce roztoku je rovnováhy dosaženo přibližně za 18 hodin), proto se u metody sedimentační rovnováhy používá menší objem vzorku. Přesnějších výsledků je dosaženo, pokud je stejný vzorek měřen při několika různých (postupně se zvyšujících) rychlostech a různých koncentracích. Jeden experiment tak trvá i několik dnů.

Sedimentační rovnováha je jednou z nejpřesnějších metod stanovení molekulové hmotnosti molekuly a použití nachází i při studiu interakcí makromolekul (stanovení stechiometrie, disociační konstanty). Na druhou stranu vyžaduje metoda sedimentační rovnováhy vysokou čistotu vzorku.

Úloha 2: Emulzi olej/voda rozdělíte na jednotlivé frakce pomocí stolní minicentrifugy a vysokootáčkové centrifugy s různými typy rotorů

Pomůcky: Stolní centrifuga, vysokootáčková centrifuga, vortex, 15 ml a 50 ml centrifugační kyvety, mikrozkušavky, mikropipety

Chemikálie: olej, voda

Postup:

1. Smíchejte 1 díl oleje s 1 dílem vody.
2. Pomocí vortexu vytvořte dobře smíchanou emulzi.
3. Odpipetujte 1,5 ml emulze do připravené a popsané mikrozkušavky (takto připravte dva stejné vzorky).
4. Přelejte 15 ml emulze do připravené a popsané centrifugační kyvety.
5. Začněte pracovat na minicentrifuze - 1,5 ml mikrozkušavku centrifugujte na stolní minicentrifuze 3 minuty.
6. Dále pracujte na vysokootáčkové stolní centrifuze:
 - a. zapněte centrifugu kolébkovým vypínačem,
 - b. otevřete víko centrifugy,
 - c. zkontrolujte, zda je nasazen výkyvný rotor na 15 ml centrifugační kyvety, pokud tomu tak není rotor vyměňte,
 - d. umístěte kyvety do rotoru tak, aby byl rotor vyvážen (stejně naplněné kyvety umístěte proti sobě, v případě potřeby použijte vyvažovací zkumavky),
 - e. nastavte program tak, abyste centrifugovali při následujících hodnotách:
typ rotoru – swing-out + příslušné číslo z rotoru
otáčky – 3 500 rpm
doba centrifugace – 3 min
teplota, při níž bude centrifugace probíhat – RT,
 - f. ujistěte se, že víčka kyvet jsou řádně zašroubována,
 - g. zaklapněte víko centrifugy,
 - h. zapněte centrifugaci tlačítkem start.
7. Nyní přejděte k centrifugaci emulze v druhé 1,5 ml mikrozkušavce na vysokootáčkové stolní centrifuze. Postupujte jako v předcházejícím případě, ale centrifugu a centrifugační program upravte následovně:
 - a. vyměňte výkyvný rotor na kyvety za rotor s pevným úhlem na 1,5 ml zkumavky.
 - b. umístěte 1,5 ml zkumavky do rotoru tak, aby byl rotor vyvážen (stejně naplněné zkumavky umístěte proti sobě, v případě potřeby použijte vyvažovací zkumavky),

- c. nastavte program tak, abyste centrifugovali při následujících hodnotách:
 - typ rotoru – pevný + příslušné číslo z rotoru
 - otáčky – 3 500 rpm
 - doba centrifugace – 3 min
 - teplota, při níž bude centrifugace probíhat – RT,
 - d. ujistěte se, že jsou zkumavky řádně zavřeny,
 - e. zašroubujte víko rotoru,
 - f. zaklapněte víko centrifugy,
 - g. zapněte centrifugaci tlačítkem start.
8. Diskutujte efektivitu rozdělení emulze za použití stolní minicentrifugy a vysokootáčkové centrifugy s různým typem rotoru.

Literatura:

C9320 Metody biochemického výzkumu – cvičení: Analytická ultracentrifugace
Galuszka P., Luhová L.: Laboratorní technika pro biochemiky, Olomouc 2005