

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Praktická cvičení z chemie pro studenty středních škol

Obsah:

1. Odměřování v chemii
2. Izolace DNA z vepřové sleziny a důkaz DNA
3. Nativní elektroforéza izoenzymů peroxidasy
4. Metoda odhalování otisků prstů
5. Důkaz přítomnosti krve na místě činu

1. Odměřování v chemii

1.1 Váhy a vážení

Ke stanovení váhového množství látky se používají v chemické laboratoři váhy. Princip vážení je porovnání neznámé hmotnosti předmětu (navážovací lodička, vzorek) se známou hmotností standardu (závaží). Mechanické zařízení je založeno na docílení rovnováhy na páce a má tvar známých miskových vah. Na stejném principu byly dříve konstruovány i analytické váhy (postupné přidávání závaží).

V současné době se již užívají jednomiskové váhy používající promítací stupnice na stínítko. V laboratoři se používají pro přesné navážení látek analytické váhy a pro méně přesné vážení předvážky.

1.2 Odměřování roztoků

K odměřování objemů kapalin slouží odměrné válce, pipety, byrety a odměrné baňky (Obr.1).

Odměrné válce (Obr. 1-a) se používají jen k přibližnému odměřování kapalin. Na přesnější měření objemů se používají pipety buď pouze pro určitý objem, nebo dělené a byrety u nichž je možno kohoutkem regulovat vytékání kapaliny. Při plnění pipet je třeba vždy dbát toho, aby ústí pipety bylo stále ponořeno pod hladinou kapaliny (jinak by se nasál vzduch do pipety). Pro nasávání kapaliny do pipety nebo naopak k vypouštění kapaliny z pipety se používají speciální gumové balónky. Z důvodu bezpečnosti a ochrany zdraví se nepipetuje ústy. Při odečítání je nutno mít oko ve stejné úrovni se značkou. Odečítáme vždy spodní okraj menisku. Tyto skleněné pipety, do kterých se nasává tekutina ústy nebo pomocí balonku, se dnes už v moderních laboratořích nepoužívají, jsou nahrazeny automatickými pipetami, které mohou být konstruovány na určitý fixní objem, nebo jsou nastavitelné v určitém rozsahu objemů.

Automatické pipety jsou vyráběny pro různé rozsahy objemů (5-1 mL, 1000-200 μ L, 200-20 μ L, 20-2 μ L a 2-0,2 μ L). Objem se nastavuje otočením šroubu na stupnici. Nasávání a vypouštění kapaliny přes plastovou špičku je ovládáno pístem, který má tři polohy – klidovou, pro nasávání a pro vypouštění (Obr. 2). Plastové špičky jsou na jedno použití. Práce s automatickými pipetami je výrazně pohodlnější a také rychlejší na rozdíl od klasických skleněných pipet.

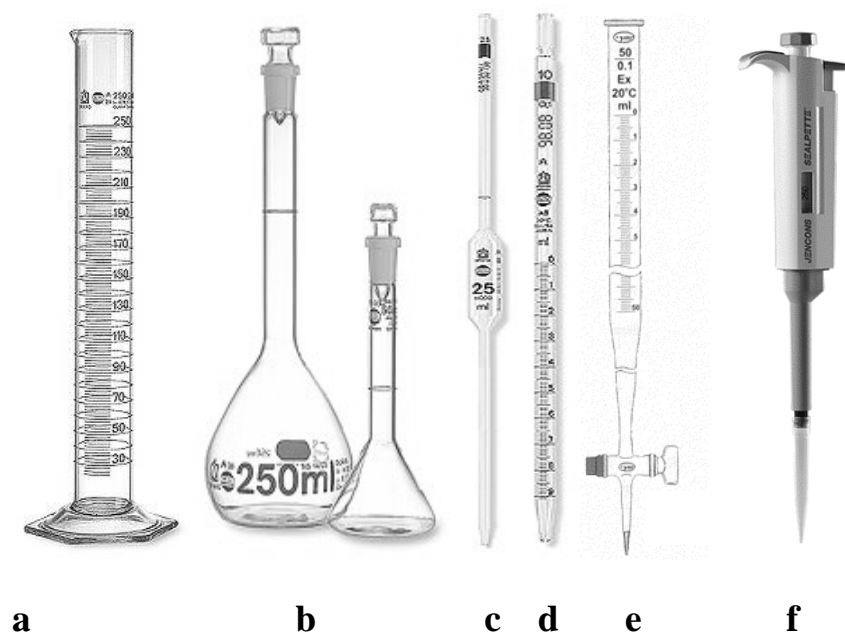
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Odměrné baňky (Obr. 1-b) jsou kalibrovány na dolítí – to znamená, že při jejich naplnění obsahují právě požadovaný objem. Hrdlo odměrných baněk je poměrně úzké a je opatřené ryskou. Plní se tak, aby se spodní okraj menisku dotýkal rysky a při plnění musíme mít oko v úrovni rysky. Odměrné baňky se vyrábějí v objemech od 5 mL do 2 L. Odměrné baňky jsou používány k přípravě roztoků o přesné koncentraci. Byrety, sloužící k odběru kapalin při titracích (Obr. 1-e), jsou skleněné trubice opatřené dělicími značkami. Jejich tvar je podobný skleněným pipetám, avšak byrety mají před výpustí kohoutek nebo pružnou tlačku s hadičkou.

Obr. 1 Pomůcky k měření objemů (a- odměrný válec, b- odměrná baňka, c- skleněná pipeta nedělená, d - skleněná pipeta dělená, e - byreta, f - automatická pipeta)

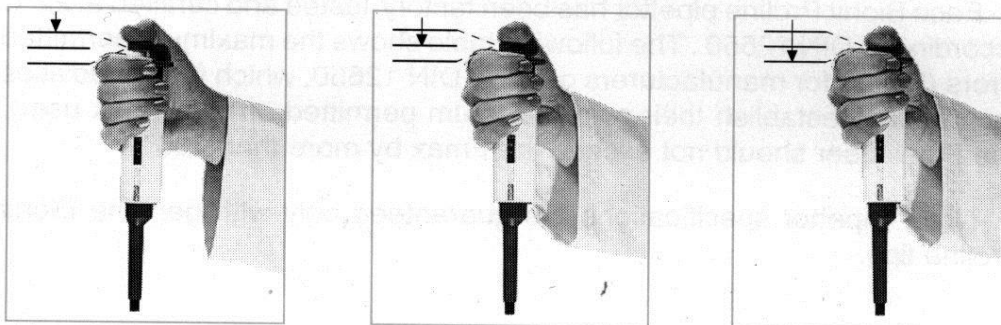


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Obr. 2 Práce s automatickou pipetou:



1.3 Experimentální část

V praktické části cvičení se seznámíte s analytickými váhami a naučíte se vážit na předvážkách. Vaším úkolem bude co nejpřesněji napipetovat 10 x 5 ml a 10 x 1 ml destilované vody do kádinek. Hustotu vody budeme pro jednoduchost považovat rovnu 1 g/ml. Počet gramů bude odpovídat počtu odměřených ml. Na začátku měření si zvažte prázdnou suchou kádinku (váhu kádinky si zaznamenejte do tabulky). Poté napipetujte 10 x 5 ml nebo 10 x 1 ml do kádinky. Poté zvažte kádinku s napipetovanou vodou. Z hodnot odečtete váhu kádinky.

Tabulka 1: Pipetování

| | |
|------------------------------------|------------------|
| Hmotnost kádinky (g) | |
| | |
| Hmotnost kádinky a vody (g) | |
| 10 x 1 ml | 10 x 5 ml |
| | |
| Hmotnost vody (g) | |
| | |
| Chyba stanovení (%) | |
| | |

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

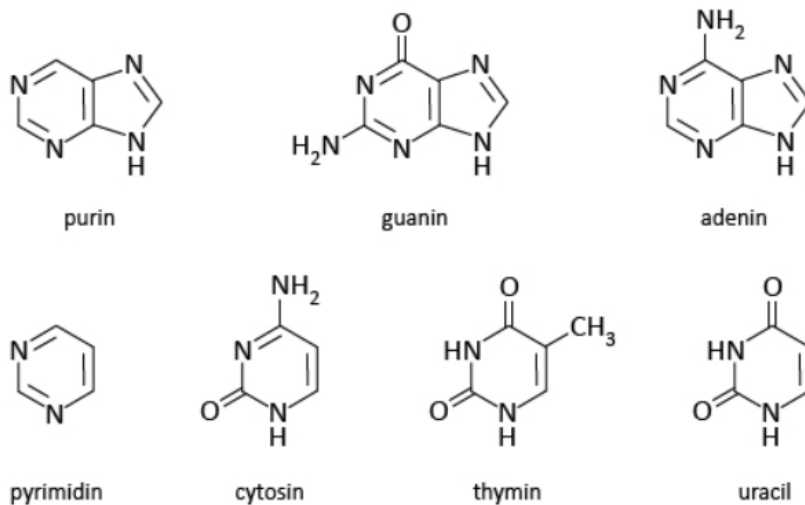
Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

2. Izolace DNA z vepřové sleziny a důkaz DNA

2.1. Teoretický úvod

V roce 1869 byly objeveny nukleové kyseliny jako složky buněčného jádra. Jedná se o vysokomolekulární sloučeniny, které se úplnou hydrolýzou štěpí na heterocyklické organické báze, sacharid (pentosu) a kyselinu fosforečnou. Kyselina deoxyribonukleová (DNA) obsahuje sacharid 2-deoxyribosu a kyselina ribonukleová (RNA) obsahuje ribosu. Stavebními jednotkami nukleových kyselin jsou pyrimidinové a purinové báze. Mezi pyrimidinové báze (Obr. 3) patří cytosin (C), thymin (T) a uracil (U), které *N*-glykosidickou vazbou s ribosou v molekule RNA nebo 2-deoxyribosou v molekule DNA vytvářejí nukleosidy cytidin, thymidin a uridin. Podobně purinové báze (Obr. 3) adenin (A), guanin (G) a hypoxanthin vytvářejí nukleosidy adenosin, guanosin a inosin. Všechny nukleosidy vytvářejí esterovou vazbou s fosfátem nukleotidy (Obr. 4). Báze typické pro DNA jsou A, T, C, G, v molekule RNA je T nahrazen U. Molekula RNA je výrazně méně stabilní než molekula DNA.

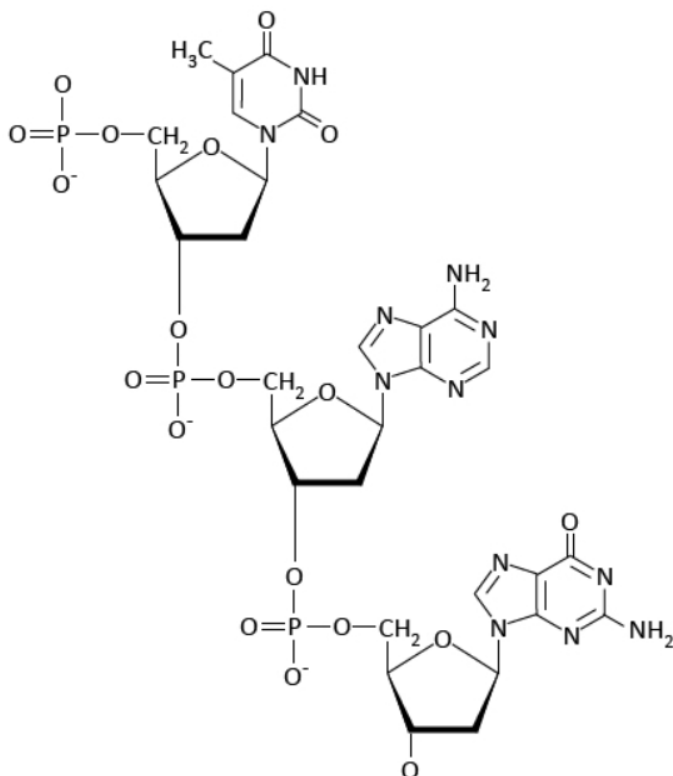


Obr. 3 Purinové a pyrimidinové báze

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016



Obr. 4 Nukleotidy spojené v řetězec

2.2 Experimentální část

1. Úkol: Izolace DNA ze sleziny

Materiál:

Vepřová slezina, mořský písek, křemenná kyveta (1 cm), centrifugační zkumavka, odměrný válec (100 ml), pH papírky, kádinka (1000 ml), skleněná tyčinka, kádinka (100 ml), špachtle, zkumavka (5 a 10 ml), třecí miska s tloučkem, prkýnko, nůž, stojánek na zkumavky, Pasterova pipeta, lžička, špičky, stopky.

Chemikálie:

0,5% NaOH, diethylether, ethanol, 1 M NaCl, koncentrovaná HCl, difenylaminové činidlo (do 100 ml 1% roztoku difenylaminu v ledové kyselině octové se přidá 2 x 75 ml koncentrované kyseliny sírové).

Postup:

- Navážku 10 g sleziny nakrájejte a následně v třecí misce rozetřete s trochou mořského písku na jemnou kaši.
- Přidejte 100 ml vychlazeného 1 M NaCl postupně po malých dávkách a za stálého roztírání. Homogenizujte 15 min.
- Homogenát centrifugujte při 5000 x g, 10 min, 4 °C. Mezitím si připravte 600 ml vychlazené destilované vody do 1 l kádinky.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

- Supernatant převedte do čisté kádinky a z ní ho pomalu v tenkém proudu kontinuálně nalijte do vychlazené destilované vody, poté velmi jemně promíchejte pomocí dřevěné špejle. DNA se sráží ve formě opaleskujících vláken.
- Za použití dřevěné špejle navíjejte vlákna DNA a ty přenášejte do malé a velké zkumavky a zbytek uchovejte v kádince pro další experimenty, při 4 °C.

2. Úkol: Důkaz DNA difenylaminem

Difenylamin poskytuje s DNA modré zbarvení. Izolovanou DNA rozdělíme na dvě části. Do zkumavek přeneseme první část izolované DNA, přidáme 1 ml 0,5% NaOH a po promíchání a rozpuštění přidáme 1 ml difenylaminového činidla a zahříváme 10-20 min na vroucí vodní lázni. Pozorujeme vývoj zbarvení.

3. Úkol: Spektrální stanovení nukleových kyselin

Nukleové kyseliny absorbují záření v ultrafialové oblasti, maximum absorpce je při 260-265 nm. Při stanovení je nutné dbát na čistotu preparátu, protože ruší přítomnost proteinů a aromatických látek. Pro stanovení se využívá vlnové délky 260 nm. Ke druhému podílu vyizolované DNA v malé zkumavce přidáme 0,5 ml 0,5% NaOH. Do křemenné kyvety napipetujeme 2 ml 0,5% NaOH a přidáme 20 μ l DNA v roztoku NaOH. Měříme absorpční spektra v UV oblasti v rozsahu 200 - 290 nm. 0,5% NaOH slouží jako blank.

3. Nativní elektroforéza izoenzymů peroxidasy

3.1 Teoretický úvod

Elektroforetické metody jsou separační techniky, které využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. Migrace iontů v elektrickém poli se využívá pro analytické dělení biologických látek. Částice látek nesoucí náboj, rozpuštěné v elektrolytu se pohybují v elektrickém poli rychlostí, která je přímo úměrná intenzitě vloženého pole, poměru náboje iontů a jeho velikosti a odporu prostředí. Byla vytvořena celá řada elektromigračních technik a jejich modifikací. V praktickém cvičení bude demonstrována nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu zaměřená na rozdělení izoenzymů peroxidasy, které jsou přítomné v rostlinném materiálu. Izoenzymy katalyzují stejný druh reakce, mohou se však lišit svou strukturou, vazebným místem nebo molekulovou hmotností, lze je proto oddělit různými separačními metodami. Ve cvičení izolované peroxidasy katalyzují redukci peroxidu vodíku za současné oxidace jiné sloučeniny. O peroxidasách je známo, že se vyskytují ve velkém množství izoform. Například peroxidasa z křene obsahuje 14 různých izoform. Peroxidasy byly nalezeny ve všech rostlinných pletivech. Jejich molekulová hmotnost je v rozmezí 42-158 kDa.

3.2 Experimentální část

Materiál:

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Klíčící rostliny hrachu, listy různých rostlin.

Přístroje:

Centrifuga, vortex, aparatura na elektroforézu, zdroj pro elektroforézu.

Chemikálie:

Připravené polyakrylamidové gely

Extrakční pufr pro nativní elektroforézu (0,1 M Tris-HCl, pH 7)

Elektrodový pufr pro nativní elektroforézu

60% glycerol, 0,02% bromfenolová modř

Barvicí roztok s 4-chlor-1- naftolem.

Postup:

1. Úkol: Příprava vzorků:

Na předvážkách odvažte rostlinný materiál, který přenesete do třecí misky, zalijete tekutým dusíkem a materiál rozetřete na prášek. Poté přidáte 0,1 M Tris-HCl pufr, pH 7 (1 ml na 1 g váhy materiálu). Homogenát přenesete do dvou plastových mikrozkupek a zcentrifugujete (10 minut, na stolní mikrocentrifuze při 3000 g). Rostlinný extrakt přenesete do čisté mikrozkupek. Vzorek pro elektroforézu se připraví smícháním rostlinného extraktu s 60% glycerolem v poměru 3:1. Před nanášením na gel promíchejte na vortexu.

2. Úkol: Elektroforéza vzorků:

Vedoucí cvičení připraví aparaturu pro elektroforézu a vaším úkolem bude nanést vzorek do jamek gelu. Do jamek aplikujte maximálně 20 μ l vzorku. Nezapomeňte si zapsat pořadí vzorků a objem, který jste do jamky napipetovali. Vedoucí cvičení vloží komůrku do elektroforetické vany, naplní ji až po značku elektrodoým pufrem, komůrku uzavře víkem a připojí ji ke zdroji napětí. Nejprve nastaví napětí 100 V, až bromfenolová modř v krajních jamkách doputuje na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu, zvýší vedoucí cvičení napětí na 180 V. Po doputování zóny bromfenolové modři na úroveň dolního okraje gelu, vedoucí cvičení zdroj vypne, odstraní víko a vylije elektrodový pufr do odpadu. Skla uvolní ze stojánku a pomocí plastové špachtle oddělí skla od gelu. Zaostřovací gel odřeže od dělicího gelu. Orientaci gelu označí odkrojením jednoho ze spodních rohů gelu. Gel přenesete do nádoby s cca 15 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7.

Upozornění: Při nanášení vzorků na gel, práci s aparaturou a gely, stejně tak při samotné přípravě gelů je nutné pracovat v ochranných rukavicích. Gely obsahují neurotoxin akrylamid a bis-akrylamid, obě látky mají kumulativní charakter - vážou se v tukové tkáni!

3. Úkol: Barvení gelu - detekce izoenzymů peroxidasy

Po 5 minutách na třepačce pufr odstraňte a přidejte barvicí roztok obsahující 4-chloro-1- naftol a peroxid vodíku.

Po 5 - 20 minutách barvení (podle intenzity vybarvení) odstraňte barvicí roztok a gel několikrát propláchněte destilovanou vodou.

4. Úkol: Dokumentace gelu

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Gel přeneste na čistou skleněnou podložku, po kterou podložíte bílý papír. Gel si můžete vyfotit nebo překreslit do pracovních listů.

4. Metoda odhalování otisků prstů pomocí ninhydrinu

4.1 Teoretický úvod

Jedná se o odhalení otisků na různých typech papírů i hrubých tapetách. Stopy mohou být i několik let staré. Ninhydrin je vysoce citlivé činidlo na aminokyseliny, peptidy a proteiny, které se dostanou na papír s otiskem prstu. Během ninhydrinové reakce dojde nejprve k dekarboxylaci aminokyseliny, vzniklý amin pak podléhá oxidační deaminaci. Ninhydrin vystupuje jako oxidační činidlo a sám se přeměňuje na růžový nebo modrofialový zbarvený produkt Obr. 5.

Materiál: 2 kádinky (100 ml), odměrný válec (50 ml), pipeta 5 ml, skleněná tyčinka, pinzeta, rozprašovač, sušárna (nebo fén), papír, lžička.

Chemikálie:

0,2 % ninhydrin (0,1 g ninhydrinu, 50 ml ethanolu a 1,5 ml kyseliny octové - 99%).

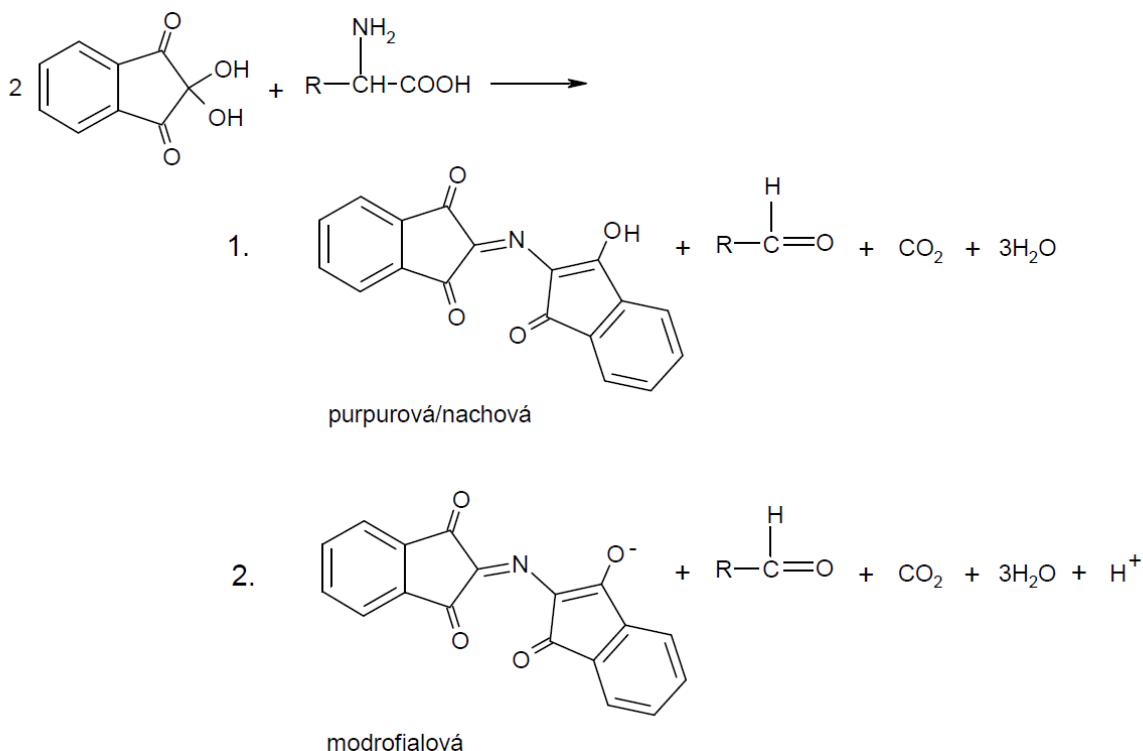
Postup:

Pro otisky prstů je vhodný papír do tiskárny. Veškeré následující operace musí být provedeny v digestoři a s ochrannými rukavicemi. Na papíru vytvořte otisky prstů. Papír přestříkejte ninhydrinovým roztokem a nechte volně usušit. Poté papír zahřejte v sušárně (5-10 minut). Pozorujte vzniklé otisky prstů. Roztok s přídavkem kyseliny octové zvýrazní otisky do purpurové barvy. Pokud se použije roztok bez kyseliny octové, otisky prstů se zbarví do fialové (popř. modré).

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016



Obr. 5 Reakce ninhydrinu s aminokyselinami v (1) kyselém a neutrálním (2) prostředí.

5. Důkaz přítomnosti krve na místě činu

5.1 Teoretický úvod

Roztok luminolu odhalí i stopové množství krve, které je pouhým okem neviditelné. Luminol společně s peroxidem vodíku vykazuje silnou chemiluminiscenci v přítomnosti hemu (krve). Luminol je oxidován v zásaditém prostředí peroxidem vodíku na diazachinon a postupně až na peroxideanion. Z oxidačního produktu se za katalýzy hemovou skupinou odštěpuje molekula dusíku a vzniká excitovaný anion kyseliny aminoftalové. Vyzářenou energií v podobě světla se molekula opět dostává do základního energetického stavu (Obr. 6).

Materiál:

Kádinky (100 ml, 250 ml), rozprašovač, pásky bavlněné látky, odměrný válec (10 ml), lžička, váhy, pipety, rukavice.

Chemikálie:

Roztok luminolu (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion): 0,1 g luminolu a 5 g uhličitanu sodného se rozpustí ve 100 ml destilované vody a k tomuto roztoku se přidá 15 ml 33% peroxidu vodíku. Roztok se přelije do rozprašovače.

Vepřová krev, kečup, thiokyanatan železitý, hemoglobin.

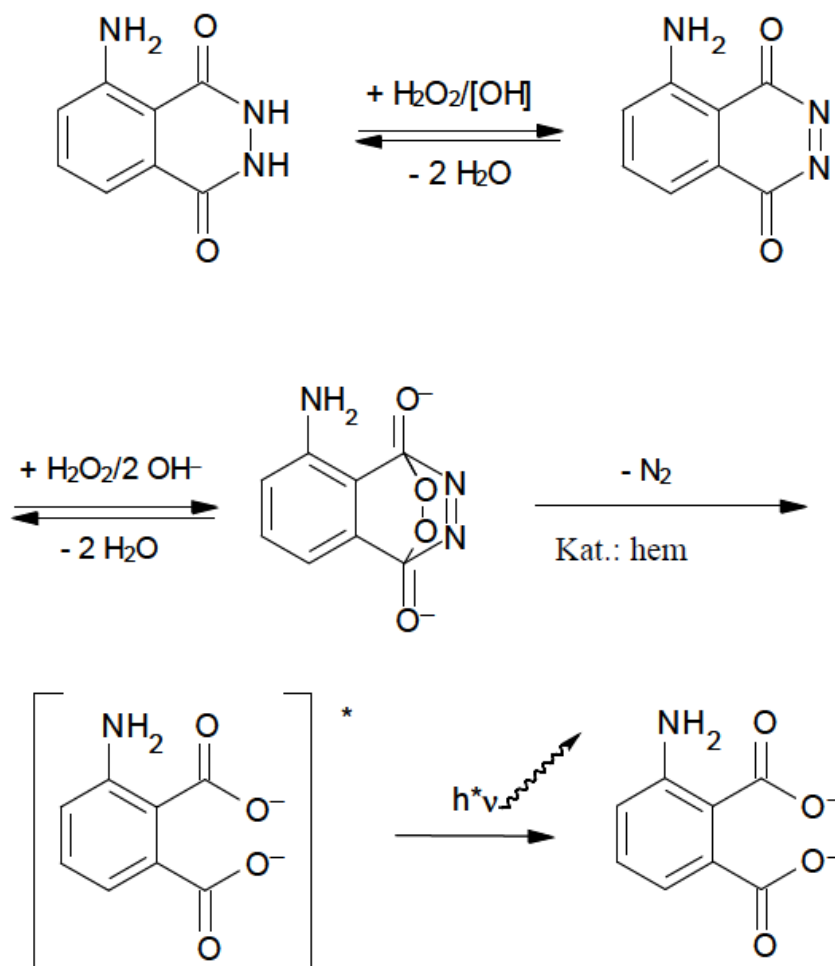
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Postup:

Na kousek bavlněné látky nakapejte několik kapek vepřové krve, roztok hemoglobinu, kečup thiokyanatan železitý. Připravený roztok luminolu přelejte do rozprašovače tak, aby nerozpustný zbytek zůstal v kádince. Tkaninu s pravými a falešnými stopami krve přeneste do temné komory, postříkejte ji připraveným roztokem luminolu. Po přestříkání se místa s krví rozsvítí namodralým světlem, falešné skvrny nedávají žádnou reakci.



Obr. 6. Reakce luminolu s krví v přítomnosti peroxidu vodíku (katalyzátorem je hem).



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016