

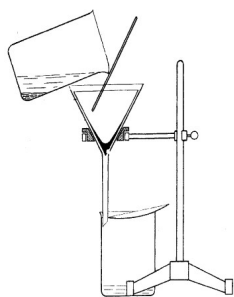
FILTRACE

Filtrace je jednou z nejstarších separačních technik. Je to fyzikálně chemická metoda užívaná k dělení látek v různých fázích – nejčastěji k oddělování látek v tuhé fázi od kapaliny. K stejnému účelu lze v jednoduchých případech použít též **dekantaci**, která spočívá v tom, že se pevná fáze nechá usadit na dně nádoby a čirá tekutina se opatrně oddělí buď slitím, nebo lépe odsátím. Tato metoda často filtraci předchází. Promývání sedimentu v dekantační nádobě je mnohem rovnoměrnější než při promývání na filtru.

Filtrace slouží např. k oddělení sraženin od roztoku, při odstraňování nečistot (částic nebo mikroorganismů) z kapalin (příprava fáze pro HPLC), sušení rozpouštědel, sterilizaci roztoků apod.

K filtraci se používá porézní materiál ve formě filtrů. Materiálem může být speciální papír s různými vlastnostmi a různou velikostí pórů, slinuté zrnité sklo, skleněná vlákna, speciální membrány z nejrůznějších materiálů (nylon, polyamid, polykarbonát, celulóza, acetát celulosy, nitrát celulosy).

Filtračních papírů se vyrábí velké množství druhů, k nejznámějším patří např. Schleicher & Schuell, Whatman, Sartorius. Liší se velikostí pórů, chemickým složením, tvarem a rozměry (viz tab.) Pro daný účel je na základě vlastností vybírán vhodný filtr. Silně zásadité roztoky a silná oxidační činidla papír rozrušují. Pro některé účely jsou vyráběny i papíry se speciálními přísadami, např. s přísadou aktivního uhlí pro odbarvování roztoků.



Gravimetrická filtrace

Nejjednodušším postupem je filtrace přes papírové filtry vložené do nálevky. Rozlišujeme dva základní postupy: gravitační filtraci a vakuovou filtraci. Při *gravitační* filtraci se filtr odpovídající velikosti a příslušné porosity vkládá do filtrační nálevky. Nálevka je obvykle skleněná, pokud nefiltrujeme organické rozpouštědlo, může být i plastová. Filtry se volí buď ve formě kruhových výseků, nebo skládané. Kruhový filtrační papír se přeloží v osách na sebe kolmých dvakrát a rozevře do tvaru kužele. Tuhé částičky se při filtraci zachytí na filtru a čirá kapalina (filtrát), protéká do podložené nádoby.



Kruhový filtrační papír



Skládaný filtrační papír



Zapojení odsávací baňky s Buchnerovou nálevkou na vakuum

Při *vakuové* filtraci se průtok rozpouštědla filtrem urychluje pomocí sníženého tlaku. Při klasickém provedení se k filtraci používá speciální skleněná nebo porcelánová nálevka s dírkovaným plochým dnem (**Büchnerova nálevka**). Do ní se vkládá kruhový papírový filtr přesně pokrývající dno. Nálevka se pomocí gumového prstence nasadí do odsávací baňky, která se přes pojistnou láhev připojí ke zdroji vakua. Pojistná láhev brání vniknutí vody z vývěvy do filtrátu nebo odsátí části filtrátu vývěvou. Namísto kombinace filtračního papíru a Büchnerovy nálevky lze použít i nálevky nebo kelímky se dnem

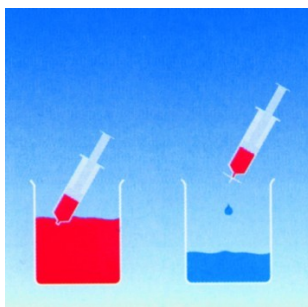
z porézního skla (**frity**). Čištění frit a filtračních kelímků musí být provedeno hned po skončení filtrace. Promývají se vodou v opačném směru, než probíhala filtrace. K promytí silně znečištěných frit lze použít kyselinu chlorovodíkovou, dusičnou nebo amoniak, k odstranění lipidů organická rozpouštědla (petrolether, alkohol).

V moderních laboratořích jsou k filtracím používány různé modifikace klasické vakuové filtrace. Komerčně se vyrábí různé filtrační systémy. Bývají často vyrobeny z plastu, méně snadno se rozbijí, jejich chemická odolnost je značná. K filtracím se používají různé typy membrán. Použití těchto filtračních systémů v kombinaci s různými typy membrán je mnohostranné – od prostého čištění rozpouštědel a mobilních fází, přes použití v mikrobiologii k zachycování mikroorganismů, po separaci buněk, organel a dalších částic (viz též mikrofiltrace).

Pro rychlé a snadné čištění malých objemů vzorků kapalin např. pro HPLC nebo plynovou chromatografii se používají jednorázové mikrofiltry.



Filtrační aparatura pro filtraci mobilní fáze



Použití jednorázových filtrů



Sériové napojení dvou jednorázových filtrů se stříkačkou

Příklady a charakteristika běžných celulosových filtračních papírů Munktell Filtrak

Druh	Charakteristika	Vhodné použití
388	velmi rychlý průtok, široké póry	hrubé vločkovité a objemné vzorky
389	rychlý průtok, středně široké póry	pro běžnou analytickou práci
390	pomalý průtok, úzké póry	filtrace jemných vzorků
391	velmi pomalý průtok, jemné póry	jemnozrnné vzorky
392	středně rychlý průtok	rutinní laboratorní práce, rychlá filtrace jemných vzorků
393	nejpomalejší průtok, extra jemné póry	extra jemné vzorky

Charakteristika běžných celulosových filtračních papírů Whatman

Grade	Záchyt částic (μm)	Charakteristika
40	8	střední filtrační rychlost
41	20-25	vysoká filtrační rychlost, vhodný pro záchyt velkých částic
42	2,5	střední filtrační rychlost se záchytem nejjemnějších částic
44	3	vyšší filtrační rychlost, ale méně účinný při záchytu jemných částic
50	2,7	tvrzený, vysoká pevnost za mokra, vhodný pro vakuovou filtraci
52	7	tvrzený, vysoká pevnost za mokra, vhodný pro vakuovou filtraci
54	22	tvrzený, vysoká pevnost za mokra, vhodný pro vakuovou filtraci

DIALÝZA

Dialýza je separační proces založený na rozdílné rychlosti transportu látek z roztoku o vyšší koncentraci do roztoku o nižší koncentraci přes pórovitou membránu, oddělující oba roztoky. Pro transport přes membránu je přitom rozhodující velikost molekul. Rychlost pohybu částic je tím větší, čím jsou částice menší. S klesající koncentrací částic se rychlost transportu snižuje. V okamžiku, kdy se koncentrace látek procházejících membránou na obou stranách membrány vyrovnají, transport se zastaví.

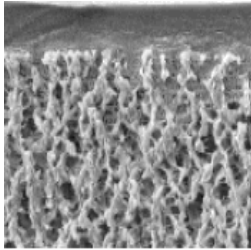
Pro velké částice nemusí být membrána vůbec propustná. Metoda se používá zejména pro oddělení malých molekul (často anorganických sloučenin) od makromolekul (bílkovin, polysacharidů, nukleových kyselin atd.). Typickým příkladem je odsolení roztoku proteinů.

Na dialýzu se používají různé typy membrán. Dříve se používaly dialyzační membrány např. z celofánu. Dnes se nejčastěji používají umělé membrány s vhodnou velikostí pórů ve tvaru dlouhé trubice různého průměru (*slang.* označovaná jako dialyzační střeva).

Přiměřený úsek dialyzační trubice se na jednom konci zaváže nití nebo uzavře speciální svorkou. Nejdříve se membrána dobře propláchne destilovanou vodou, aby se vymyly impregnační látky. Po té se naplní roztokem, který má být dialyzován, a uzavře se i na druhém konci. Váček se ponoří do nádoby s vodou nebo pufrem o nízké iontové síle. Malé molekuly z dialyzovaného roztoku difundují přes membránu, velké molekuly jsou zadržovány ve váčku. Rychlost dialýzy závisí na koncentračním spádu (zpočátku je rychlejší, postupně se zpomaluje), který je především ovlivněn poměrem objemů vně a uvnitř membrány. Dále rychlost dialýzy závisí na teplotě, na počtu a velikosti pórů v membráně, na velikosti plochy a síle membrány a na interakcích mezi difundujícími částicemi a membránou. Proces dialýzy značně zrychluje míchání nebo výměna vnějšího roztoku. Dialýza trvá zpravidla desítky hodin. Provádí se obvykle při nízké teplotě kolem 4°C, aby se zabránilo denaturaci makromolekul a množení mikroorganismů.

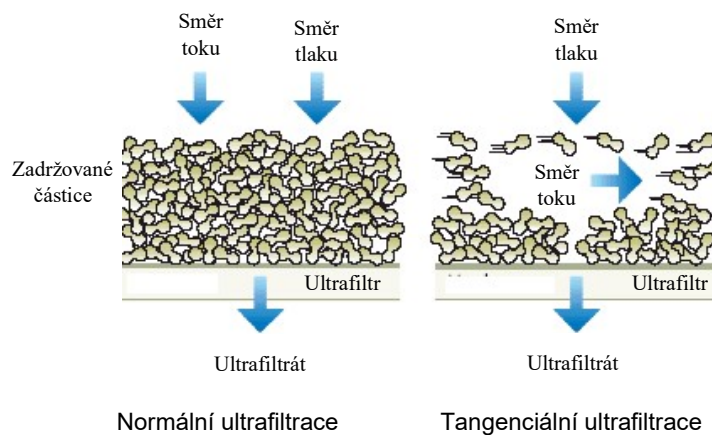
MEMBRÁNOVÁ MIKROFILTRACE A ULTRAFILTRACE

Membránová ultrafiltrace kombinuje princip dialýzy a tlakové filtrace. Je to proces, při kterém rozpouštědlo a rozpuštěné látky přecházejí přes semipermeabilní membránu působením tlaku. Přes membránu přechází molekuly rozpouštědla a ty rozpuštěné látky, které jsou propuštěny na základě velikosti své molekuly. Určujícím faktorem je tedy pórovitost membrány. Tlak na membránu je vyvíjen buď působením stlačeného inertního plynu, peristaltickými pumpami, působením odstředivé síly v centrifuze nebo vakua. Hodnoty tlaku jsou obvykle do 1 MPa. Ultrafiltrační membrány (ultrafiltry) jsou tvořeny dvěma vrstvami: tenkou vrstvou 0,1–1,5 μm o rozměrech pórů 0,1–50 nm a podpůrnou vrstvou s větší velikostí pórů. Na membráně jsou selektivně zachycovány látky s většími molekulami (0,01–0,1 μm). Hlavním požadavkem na ultrafiltrační membránu je, aby s dostatečnou rychlostí propouštěla rozpouštědlo a nízkomolekulární látky a aby její póry měly standardní rozměr.



Porozita ultrafiltru

V některých aplikacích ultrafiltrace je průtok filtrovaného roztoku tangenciální, tj. směřuje podél membrány, zatímco tlak působí kolmo na membránu.



Roztok nad membránou označujeme jako *retentát*, přefiltrovaný roztok jako *ultrafiltrát*.

Pro zvýšení rychlosti ultrafiltrace se retentát kontinuálně míchá nebo probublává, čímž se zadržované molekuly nehromadí na povrchu membrány a nezacpávají její póry.

Při tzv. *diafiltraci* zakonzentrovaný retentát znovu zředíme čistým rozpouštědlem a pokračujeme v ultrafiltraci (podíl nízkomolekulárních látek se v retentátu postupně snižuje).

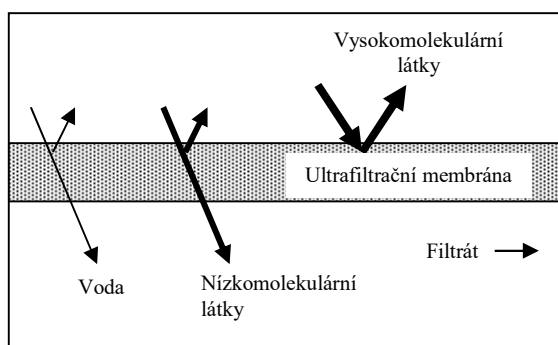
Ultrafiltrace je typicky používána k oddělení proteinů od složek pufru, k odsolení a zakonzentrování proteinů.

Mikrofiltrace je proces podobný ultrafiltraci, avšak póry v membránách jsou větší a umožňují průnik částic v rozmezí 0,2–2 μm . Tlak je obvykle nižší. Mikroporézní membrány jsou obecně rigidní, kontinuální síta polymerního materiálu s definovanou velikostí pórů. Membránová mikrofiltrace se používá k oddělení buněk, buněčných organel a dalších částic.

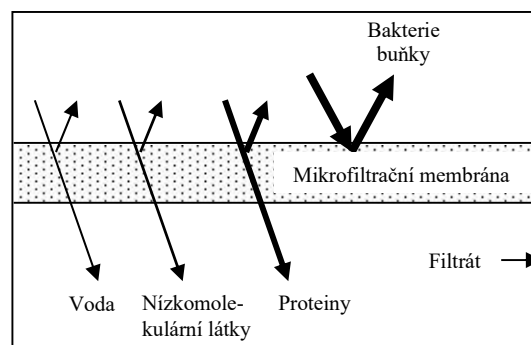


Srovnání filtračních metod

Typ separace	Velikost molekul (μm)	Použitý tlak (MPa)
Ultrafiltrace	0,01–0,1	0,1–1
Mikrofiltrace	0,2–2	< 0,1
Filtrace	> 1	$\leq 0,1$



Ultrafiltrace



Mikrofiltrace

CENTRIFUGACE

Centrifugace (odstředování) je základní laboratorní metoda využívající odstředivé síly pro separaci látek o různé hustotě, velikosti a tvaru, které by pouhým stáním, postupovalo příliš pomalu nebo by prakticky vůbec neprobíhalo. V biochemické laboratoři patří centrifugace k základním postupům, používaným k dělení směsí kapalin, odstranění sraženin, izolaci nebo odstranění buněk a subcelulárních částic, k frakcionaci makromolekul podle hustoty.

Přirozená sedimentace pevných částic způsobená gravitací je urychlena použitím centrifugy (odstředivky), ve které se zkumavky pohybují v tzv. rotoru po kruhové dráze. Působí tak na ně **odstředivá (centrifugační) síla** (F), která závisí na hmotnosti částic m a odstředivém (centrifugačním) zrychlení ($r \times \omega^2$, tj. na poloměru rotoru a na rychlosti, se kterou se rotor otáčí):

$$F = m r \omega^2 = m r (2 \pi n)^2$$

kde m – hmotnost částic (kg), r – poloměr (m), tj. vzdálenost dna centrifugační zkumavky od osy otáčení, ω – úhlová rychlost, n je frekvence otáček (s^{-1}).

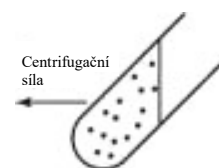
Poměr mezi centrifugačním zrychlením a zrychlením tíhovým g ($9,81 \text{ m s}^{-2}$) vyjadřuje **relativní centrifugační síla (RCF)**, z angl. relative centrifugal force):

$$\text{RCF} = r \omega^2 / g = (2 \pi n)^2 r / g$$

RCF udává, kolikrát je zvolené centrifugační zrychlení vyšší než tíhové zrychlení, udává se v násobcích tíhového zrychlení g a je bezrozměrné.

RCF se snadno vypočítá pro kteroukoli centrifugu a rotor s danou frekvencí otáček. Je-li frekvence otáček n uváděna v min^{-1} (značená též jako rpm, z angl. revolutions per minute) a vzdálenost r v cm lze po úpravě předchozího vztahu odvodit vztah:

$$\text{RCF} = 1,118 \cdot 10^{-5} r n^2$$



Místo výpočtu se k zjištění RCF používají nomogramy – viz dále.

O rychlosti sedimentace vedle centrifugační síly (tedy hmotnosti částice a centrifugačního zrychlení) rozhoduje rozdíl mezi hustotou centrifugované částice a rozpouštědla (přímo úměrně) a faktor tření (nepřímo úměrně).

Čas potřebný pro sedimentaci částic závisí vedle centrifugační síly též na efektivní (skutečné) vzdálenosti, kterou urazí sedimentující částice v roztoku (tj. na výšce roztoku ve zkumavce). Budeme-li centrifugovat vzorek ve stejném rotoru i centrifugační zkumavce, ale při jiné RCF, tak čas potřebný pro centrifugaci částic se změní přímo úměrně podle vztahu:

$$\mathbf{RCF_1 \times \mathit{čas}_1 = RCF_2 \times \mathit{čas}_2}$$

nebo po úpravě

$$\mathbf{n_1^2 \times \mathit{čas}_1 = n_2^2 \times \mathit{čas}_2}$$

Často požadujeme **duplikovat podmínky** centrifugace s využitím alternativního rotoru nebo jiné RCF. Pro výpočet alternativní RCF (nebo frekvence otáček) nebo poloměru alternativního rotoru se vychází ze vztahu:

$$\mathbf{RCF_1 = RCF_2}$$

Po dosazení a úpravě dostáváme vztahy:

$$\mathbf{RCF_1 = 1,118 \cdot 10^{-5} r_2 n_2^2}$$

$$\mathbf{r_1 \times n_1^2 = r_2 \times n_2^2}$$

Z těchto vztahů můžeme vypočítat poloměr alternativního rotoru nebo frekvenci otáček.

Centrifugy s tzv. výkyvnými rotory umožňují vychýlení nosiče zkumavek podle intenzity odstředivé síly až do horizontální roviny, podobně, jako se při zvyšujících se otáčkách vychylují sedátka řetízkového kolotoče. Výhodou je, že odstředivá síla pak působí kolmo ke dnu zkumavky, nevýhodou je omezená mechanická odolnost kloubů, ve kterých dochází k vychýlení nosiče zkumavek, takže lze dosáhnout obvykle odstředivé síly jen kolem 5000 g. Takové odstředování je vhodné především pro sedimentaci buněk a jiných větších a těžších částic.

Běžné laboratorní centrifugy s pevnými tzv. úhlovými rotory (zkumavka ve fixním úhlu, asi 25–40° k vertikální ose rotace) dosahují odstředivé síly mezi 10–30 000 g, která zcela postačuje pro rychlou sedimentaci např. sražených molekul bílkovin. Odstředivá síla v nich působí šikmo, takže i sediment na dně zkumavky je po centrifugaci zešikmený. Pro speciální techniky se používají ultracentrifugy, dosahující odstředivé síly až kolem 80 000 g. Dělení tuhé fáze od kapalné je závislé na rozdílu jejich hustot, na odstředivé síle, která je úměrná frekvenci otáčení, a na poloměru otáčení.

Centrifugy se stávají z rotoru, hnacího hřídele a motoru. Rotor se většinou nachází v uzavřeném prostoru, který je uzavřen víkem se závorou. Většina centrifug obsahuje též síťový vypínač, časový spínač, regulátor otáček, otáčkoměr a brzdu. Některé obsahují též víko rotoru, které zabraňuje vzniku aerosolu během zpomalování rotoru nebo pokud dojde k rozbití zkumavky. Během centrifugace dochází k zahřívání rotoru. Zahřívání závisí na počáteční teplotě uvnitř rotorového prostoru, rychlosti rotoru, době centrifugace a tvaru rotoru. Proto se používají chlazené centrifugy, které dokáží udržet teplotu uvnitř rotorového prostoru s přesností ± 1 °C. Většina moderních centrifug obsahuje možnost programování akcelerace a brždění rotoru, teploty rotoru, celkového času a rychlosti centrifugace zadáním frekvence otáček za minutu (rpm) nebo relativní centrifugační síly (RCF). Některé obsahují i alarm, který se aktivuje a zastaví centrifugaci, pokud rotor není přesně vyvážen.

Podle dosahovaného odstředivého zrychlení, resp. frekvence otáček, konstrukce a účelu, se centrifugy zhruba dělí na nízko-, středně- a vysokootáčkové. K vybavení běžné klinicko-biochemické laboratoře,

provádějící standardní vyšetření, stačí zpravidla centrifugy **nízkootáčkové** s max. rychlostí kolem 5 000 ot./min, **středněotáčkové** s rychlostí kolem 10 000 ot./min a tzv. **mikrocentrifugy** (mikrofygy) s rotory pro 1,5ml mikrozkušavky, dosahující rychlost kolem 10 000 ot./min (přibližně 10 000 g).

K sedimentaci menších částic, např. virů a makromolekul, a pro různé analýzy prováděné v laboratorních výzkumných zaměření jsou nezbytné vysokootáčkové **ultracentrifugy**, dosahující rychlost 20 000–100 000 ot./min a RCF až přes 1 000 000 g. Rotory těchto centrifug jsou chlazené a pracují ve vakuu, čímž se omezuje odpor vzduchu a tím vyvolaný vznik tepla třením.



Mikrocentrifuga

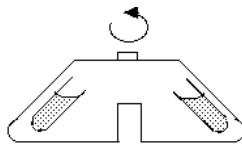


Stolní centrifuga



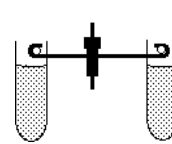
Sálová ultracentrifuga

Podle konstrukce rotoru se rozlišujeme dva základní typy – rotory výkyvné a rotory úhlové. **Výkyvné rotory** se hodí pro menší zrychlení, **úhlové rotory** masivní konstrukce a hladkého povrchu umožňují dosažení většího počtu otáček a kratší doby dělení.

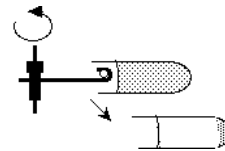


Úhlové rotory

Supernatant
Pellet

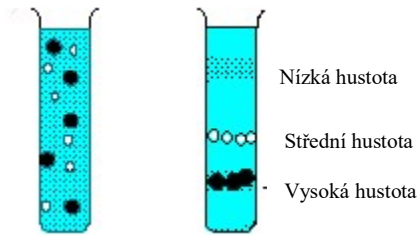


Výkyvné rotory



Způsoby centrifugace

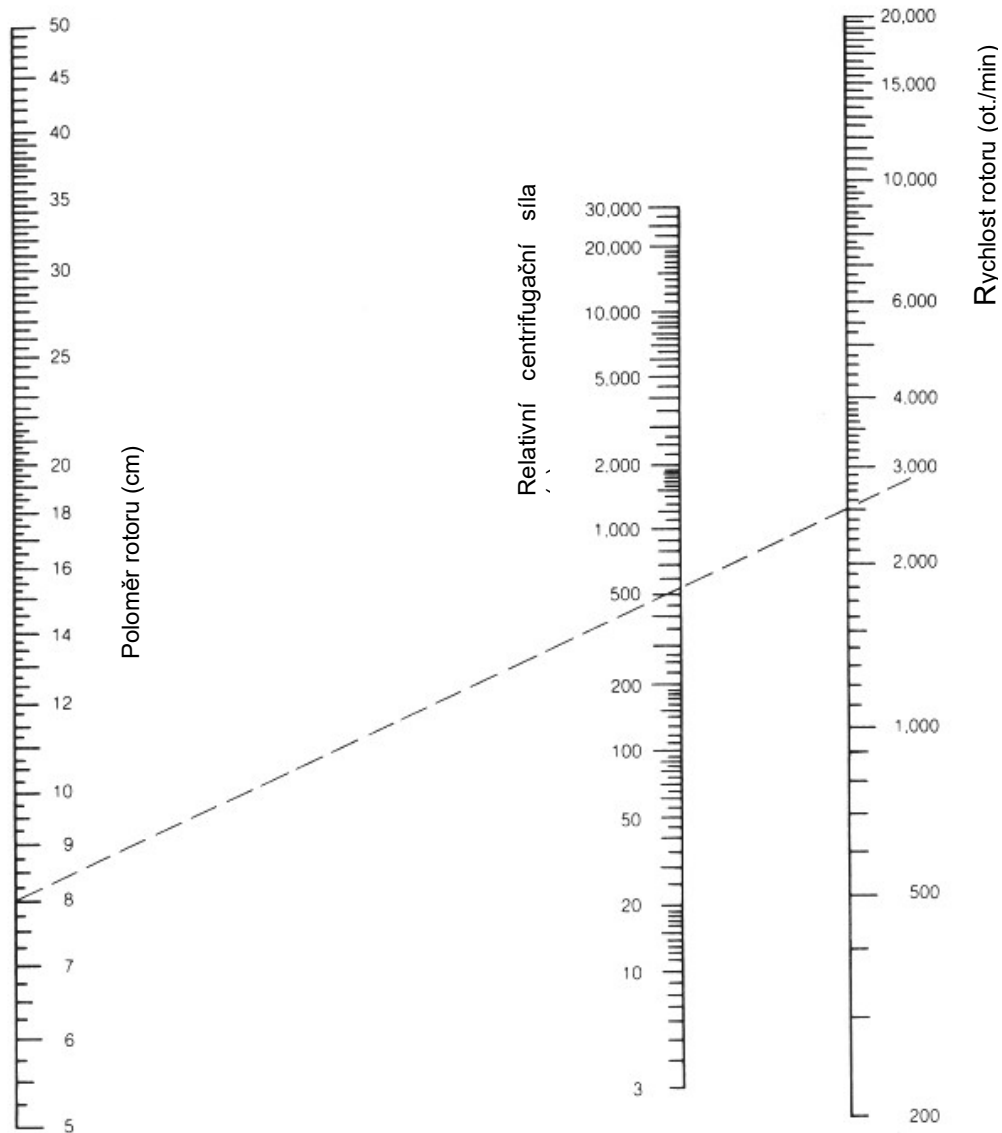
- *Analytická* centrifugace umožňuje měřit fyzikální vlastnosti sedimentujících částic, jako je sedimentační koeficient nebo molekulová hmotnost. Částice jsou sledovány optickým systémem během centrifugace při jejich pohybu v gravitačním poli.
- Při *preparativní* centrifugaci je hlavním cílem izolovat, resp. odstranit specifické částice. Preparativní centrifugace je dále členěna na diferenciální, izopyktnickou a zonální.
- *Diferenciální* centrifugace. Základem pro dělení jsou rozdíly v sedimentačních rychlostech částic. Centrifugace probíhá v homogenním mediu s podstatně nižší hustotou, než jakou mají sedimentující částice (používá se např. vodný roztok sacharózy 0,25 mol/l). Během centrifugace sedimentují různé částice různou rychlostí podle své velikosti. Dělení se provádí tak, aby určité částice jedné velikosti zcela sedimentovaly. Diferenciální centrifugace se používá zejména k odstranění buněk, k oddělení sraženiny a při separaci buněčného homogenátu na částice (resp. při odstranění některých částic z homogenátu).
- *Izopyktnická* centrifugace v *hustotním gradientu* (*zonální* centrifugace). Při tomto postupu se dosahuje rozdělení směsi částic na základě rovnovážné centrifugace. Centrifugace probíhá na principu rozdílu hustoty částic nezávisle na jejich ostatních vlastnostech. Používá se prostředí o měnící se hustotě (hustotní gradient), přičemž rozsah hustot leží v oblasti očekávaných hustot dělených částic. Hustota



Stav před a po centrifugaci

média roste od horního okraje centrifugační zkušavky ke dnu. Během centrifugace sedimentuje částice jen pokud, než se dostane do oblasti, v níž se její hustota shoduje s hustotou média (izopyknický bod). Zaujetí rovnovážné polohy vyžaduje více času (např. 24 h i více) než diferenciální centrifugace v prostředí s nízkou hustotou. K přípravě hustotního gradientu se nejčastěji používají roztoky sacharosy, polymerů (dextran, albumin, polyethylenglykol) a solné roztoky (např. CsCl).

Existují dva typy hustotních gradientů – diskontinuální a kontinuální. *Diskontinuální* gradient je tvořen několika různě hustými vrstvami. Dělené částice určité hustoty se soustředí na hranici mezi dvěma vrstvami. Při *kontinuálním* gradientu je změna hustoty plynulá v celém rozsahu dráhy (zkušavky). Metoda hustotního gradientu se používá i k dělení makromolekulárních částic polymerního charakteru (bílkovin, nukleových kyselin) lišících se měrnou hmotností.



Nomogram pro vzájemný přepočítání rychlosti rotoru a relativní centrifugační síly

Vyvažování kyvet před centrifugací

Kyvety umístěné na protilehlých stranách v rotoru (v ultracentrifugách všechny kyvety) musejí být vyváženy jednak staticky, tak i dynamicky (zvláště při ultracentrifugaci). *Statickým vyvážením* rozumíme vyvážení protilehlých kyvet (včetně jejich případných pouzder) na stejnou hmotnost na rovnoramenných vahách. Při *dynamickém vyvážení* musí mít protilehlé kyvety jak stejnou hmotnost, tak i stejně umístěné těžiště (tzn., že kyvety stejné velikosti musí být naplněny roztokem o stejné hustotě). Při nepřesném vyvážení se může ohnout osa rotoru v důsledku nerovnovážného zatížení nebo poškodit ložisko. Nevyvážené kyvety v rotoru se projeví během centrifugace silnou vibrací centrifugy. Sofistikovanější centrifugy při nerovnoměrném zatížení osy rotoru automaticky ukončí svoji činnost.

PRAKTICKÁ ČÁST

Úkol 4.1 Příprava fyziologického roztoku NaCl

Izotonický roztok NaCl (solutio natrii chloridi isotonica), nepřesně nazývaný „fyziologický“ roztok, obsahuje 154 mmol NaCl v litru roztoku. Nachází uplatnění také při práci se živočišnými buňkami a tkáněmi a je jedním ze základních infúzních roztoků používaných k zajištění iontové, vodní a acidobazické rovnováhy. Pro přípravu se používá redestilovaná voda (nebo voda pro injekci) a roztok se po přípravě sterilizuje autoklárováním.

Často je v pokusech s živočišnými tkáněmi a buňkami používán rovněž **fosfátový pufovaný fyziologický roztok PBS** (z angl. phosphate-buffered saline). Připravuje se ze tří základních roztoků, které jsou smíchány až před použitím. Složení roztoků udává níže uvedená tabulka. pH roztoku by po promíchání mělo mít hodnotu 7,2. Odchytky se upraví přidávkem zředěné HCl (1 mol/l) nebo roztokem NaOH (1 mol/l). Roztok se potom přefiltruje a sterilizuje se autoklárováním.

Materiál: Prachovnice s NaCl, filtrační papír, kádinka, skleněná tyčinka, nálevka, odměrná baňka 100 ml. Analytické váhy, váženky, špachtle.

Provedení:

1. Nejprve vypočítejte, jaké množství NaCl je třeba navážít pro přípravu 100 ml roztoku.
 - Vypočtené množství navažte na analytických vahách s přesností na 2 desetinná místa.
 - Navážené množství kvantitativně přeneste do kádinky a rozpusťte v cca 50 ml vody.
 - Jakmile je veškerá navážka rozpuštěna, přefiltrujte roztok kvantitativně do odměrné baňky. Po přefiltrování roztoku vypláchněte několikrát kádinku malým množstvím destilované vody a nakonec propláchněte ještě filtr. Potom nálevku s filtrem odstraňte a doplňte objem po rysku.
2. Jaká je koncentrace osmoticky aktivních částic ve fyziologickém roztoku?

3. Doplňte výsledné koncentrace všech složek v PBS po vzájemném smíchání roztoků A, B a C

Roztoky k přípravě PBS	Navážka/objem	Koncentrace ve výsledném PBS (mmol/l)
Roztok A		
NaCl	8 g	
KCl	0,20 g	
NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	2,89 g	
KH ₂ PO ₄	0,20 g	
redestilovaná voda	do 800,0 ml	
Roztok B		
CaCl ₂	0,10 g	
redestilovaná voda	do 100,0 ml	
Roztok C		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10 g	
redestilovaná voda	do 100,0 ml	

4. Vypočtete osmolární koncentraci PBS a porovnejte ji s osmolární koncentrací fyziologického roztoku?

Úkol 4.2 Přečištění Al₂O₃ pro chromatografii

Při chromatografických separacích se používá řada různých chromatografických materiálů. Některé z nich musí být před použitím přečištěny nebo speciálně upraveny působením různých činidel. Čištění se používá také v případě, kdy materiál již jednou použitý se znovu regeneruje pro použití nové.

Úloha je zaměřena na přečištění oxidu hlinitého pro adsorpční sloupcovou chromatografii. Jedná se o modelový úkol, jehož cílem je procvičení postupu při podtlakové filtraci.

Materiál: Prachovnice s odváženým množstvím Al₂O₃. Filtrační papír, kádinka, skleněná tyčinka, Büchnerova nálevka, gumový prstenec, odsávací baňka, stříčka, vývěva, porcelánová nebo Petriho miska, nůžky.

Provedení:

- Oxid hlinitý z prachovnice přeneste do kádinky a přidejte cca 100 ml destilované vody.
- Obsah kádinky promíchejte 10 minut tyčinkou.
- Připravte odsávací baňku a Büchnerovu nálevku. Filtrační papír zastříhněte tak, aby přesně pokrýval dno nálevky a vložte jej do nálevky.
- Pomocí gumového prstence nasadte nálevku na odsávací baňku. Baňku spojte gumovou hadičkou s pojistnou lahví a tu připojte k vývěvě.
- Filtr na dně nálevky zvlhčete destilovanou vodou a spuštěním vývěvy přisajte filtr k nálevce.
- Suspenzi oxidu hlinitého ve vodě nalijte pomocí tyčinky do nálevky a filtrujte za pomoci sníženého tlaku.
- Materiál na filtru po té postupně promyjte dalšími cca 100 ml destilované vody a odsávejte vodu, dokud není materiál téměř suchý.

- Pomocí kohoutu na pojistné lahvi po té odpojte vakuum, materiál i s filtrem opatrně oddělte a přeneste na porcelánovou nebo Petriho misku.
- Další krok při přípravě Al_2O_3 je aktivace v sušárně.

- ✍ 5. Načrtněte schéma uspořádání při podtlakové filtraci.
- ✍ 6. Popište použitý zdroj vakua a uveďte možné alternativy.

Úkol 4.3 Dialýza roztoku škrobu a chloridu sodného

Makromolekulární látky (např. škrob, bílkoviny) lze oddělit od látek poskytujících pravé roztoky membránami, které nepropouštějí koloidně dispergované částice. Běžný celofán nepropouští látky, jejichž $M_r > 10\,000$. Škrob se skládá z amylosy a amylopektinu. Relativní hmotnost amylosy je podle druhu škrobu v rozpětí 18 000–20 000, amylopektinu z bramborového škrobu je přibližně rovna 10^6 .

Materiál: Skleněná kádinka 250 ml, celofánové střevo 25 cm, provázek, nůžky, gumičky, magnetické míchadlo, míchačka, roztok NaCl (0,3 mol/l), roztok škrobu (20 g/l), Lugolův roztok (80 mmol (1/2 I₂) v 0,15 mol/l roztoku KI), roztok dusičnanu stříbrného (0,1 mol/l), odměrný válec 25 ml, zkumavky.

Provedení:

- Širokou skleněnou 250ml kádinku naplňte přibližně 70 ml destilované vody.
- Přibližně v jedné třetině délky celofánovou trubicí pevně převažte provázkem a do vzniklého váčku nalijte 20 ml směsi připravené ze stejných objemových dílů roztoků chloridu sodného a škrobu. Nad tekutinou trubicí opět převažte provázkem. Nad roztokem ponechejte malý vzduchový prostor.
- Takto připravený dialyzační váček vložte do kádinky s destilovanou vodou a magnetickým míchadlem tak, aby váček byl ve vodě. Okraje střívka přehněte přes okraje kádinky a upevněte gumičkou.
- Kádinku s dialyzačním váčkem a míchadlem dejte na míchačku. Míchadlo nesmí při pohybu narážet do váčku. Po 30 minutách dialýzu ukončete.
- Váček rozstříhnete a část roztoku co je uvnitř přelijte do zkumavky.
- Proveďte důkaz na přítomnost chloridových iontů a škrobu v roztoku ve váčku i ve vodě, v které byl ponořen dialyzační váček:
 - a) přítomnost iontů Cl^- prokážeme reakcí s AgNO_3 (ionty Ag^+ poskytují s Cl^- charakteristickou bílou sraženinu AgCl):
 - do zkumavky odpipetujte pipetkou asi 1 ml roztoku a po kapkách přidejte asi 0,5 ml roztoku AgNO_3 ;
 - b) přítomnost škrobu lze zjistit reakcí s Lugolovým činidlem (roztok jodu poskytuje se škrobem modré zbarvení):
 - do zkumavky odpipetujte plastovou pipetkou asi 1 ml roztoku a po kapkách přidejte asi 1 ml Lugolova roztoku.

7. Uvedený postup lze použít na odsolení roztoku bílkoviny, např. potřebujeme „odsolit“ 10 ml roztoku s koncentrací síranu amonného 0,5 mol/l.
- a) Vypočtete, jaká bude koncentrace soli v roztoku bílkoviny, pokud provedeme dialýzu až do ustavení rovnovážného stavu (přes noc) ve 190 ml 50 mmol/l fosfátového pufru, pH 7.
- b) Jaká bude koncentrace síranu amonného v roztoku bílkoviny, pokud takto provedeme dialýzu stejným postupem opakovaně 5krát po sobě?

Úkol 4.4 Oddělení vysrážených proteinů od supernatantu centrifugací

Rozpustnost bílkovin v roztoku lze ovlivnit změnou koncentrace iontů přítomných v roztoku nebo přidávkem organických rozpouštědel, změnou pH a rovněž teplotou. Pokud dojde k vysrážení bílkoviny z roztoku, bílkovina ztrácí své nativních vlastností (dochází k její denaturaci). Za určitých podmínek dochází k vysrážení ireverzibilnímu, čehož se využívá při odstraňování bílkovin z roztoku – jedná se o tzv. deproteinaci. Vysrážené bílkoviny lze oddělit filtrací nebo ještě lépe centrifugací.

Materiál: Centrifuga, centrifugační zkumavky, váhy na vyvážení zkumavek, mléko, roztok trichloroctové kyseliny (1 mol/l), pipetor 100–1000 μ l, špičky, pravítko.

Provedení:

- Označte si dvě centrifugační zkumavky.
 - Do první centrifugační zkumavky odměřte pipetou přesně 2 ml mléka.
 - Potom přidejte 100 μ l roztoku trichloroctové kyseliny, protřepejte a nechte stát 10 min.
 - Do druhé centrifugační zkumavky odměřte 2 ml mléka.
 - Druhou zkumavku dovažte (přidáním destilované vody) s použitím rovnoramenných vah na stejnou hmotnost jako je hmotnost první zkumavky s roztokem.
 - Obě zkumavky umístěte do rotoru centrifugy a rotor uzavřete víkem.
 - Centrifugujte 5 min při 2 500 ot./min.
 - Po skončení centrifugace porovnejte obsah obou zkumavek.
8. Změřte vzdálenost dna zkumavky v rotoru od jeho osy a přepočítejte použité otáčky centrifugace na relativní centrifugační sílu RCF (v násobcích g).
9. Použijeme-li alternativní rotor, kde vzdálenost dna zkumavky v rotoru od jeho středu bude 5 cm, tak pro dosažení relativní odstředivé síly stejné jako v předchozím příkladě bude třeba zvolit jiné otáčky centrifugace. Vypočítejte jaké?
10. Jak je nutno změnit celkový čas centrifugace v postupu, pokud snížíme otáčky z 2 500 ot./min na 1 000 ot./min a požadujeme dosažení stejných výsledků centrifugace s použitím stejného typu rotoru, centrifugačních zkumavek i objemu centrifugovaného roztoku?
11. S použitím nomogramu srovnajte frekvenci otáček rotoru (min^{-1}) s RCF pro rotor ($r = 10$ cm), je-li frekvence otáček a) 500 min^{-1} ; b) 10 000 min^{-1} .