

Ćwiczenia z biochemii

A composite image featuring two panels of microscopic plant tissue. The left panel shows a cross-section of a leaf with large, clear epidermal cells and smaller, more densely packed mesophyll cells. The right panel shows a similar cross-section, highlighting the arrangement of cells and the presence of chloroplasts. The background of the entire cover is a dark purple color with a subtle, textured pattern.

pod redakcją

Leokadii Kłyszejko-Stefanowicz

Ćwiczenia z biochemii



pod redakcją

Leokadii Kłyszajko-Stefanowicz



WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN
WARSZAWA 2005

Spis rozdziałów

	Wykaz skrótów	15
Część I	Wiomości podstawowe	23
	Wstępne uwagi praktyczne	24
	1. Roztwory	28
	2. Statystyczna ocena wyników	40
Część II	Niektóre metody fizykochemiczne	73
	3. Kolorymetria	74
	4. Chromatografia	91
	5. Elektroforeza na nośnikach	181
Część III	Analiza podstawowych składników ustrojowych	231
	6. Białka	232
	7. Cukry i proteoglikany	260
	8. Lipidy i lipoproteiny	306
	9. Nukleoproteiny i oznaczanie zawartości kwasów nukleinowych	332
	10. Kwasy nukleinowe	360
	11. Enzymy	471
Część IV	Analiza płynów ustrojowych	575
	12. Krew	576
	13. Mocz	695
	14. Soki trawienne	713
Część V	Izolowanie i analiza niektórych struktur komórkowych	735
	15. Frakcjonowanie morfologiczne komórki	734
	16. Jądro komórkowe	746
	17. Mitochondria	765
	18. Różnicowanie komórkowe na przykładzie czerwonych krwinek ptaków i ssaków	768
	19. Dodatek	775
	Skorowidz	795

Szczegółowy spis treści

Wykaz skrótów 15

Część I Wiadomości podstawowe 23

Wstępne uwagi praktyczne 24

1. Roztwory (A. Zgirski) 28

- 1.1. Stężenia roztworów 28
 - 1.1.1. Roztwory procentowe 28
 - 1.1.2. Roztwory molowe 31
 - 1.1.3. Roztwory wzorcowe (standardowe) 36
- 1.2. Roztwory buforowe 36
 - 1.2.1. Wykładnik wodorowy pH 36
 - 1.2.2. Siła jonowa 37
 - 1.2.3. Siła jonowa buforów i ich pH 38

2. Statystyczna ocena wyników (A. Zgirski) 40

- 2.1. Szereg prosty i rozdzielczy 40
- 2.2. Wartości średnie 41
 - 2.2.1. Średnia arytmetyczna 41
 - 2.2.2. Średnia arytmetyczna ważona 42
 - 2.2.3. Średnia geometryczna 42
- 2.3. Wskaźniki rozproszenia 44
 - 2.3.1. Wariancja i odchylenie standardowe 44
 - 2.3.2. Odchylenie standardowe średniej arytmetycznej 46
 - 2.3.3. Odchylenie standardowe grup połączonych 46
 - 2.3.4. Współczynnik zmienności (wskaźnik Pearsona) — odchylenie względne 47
- 2.4. Odrzucanie wyników niepewnych (wątpliwych) 48
- 2.5. Wnioskowanie statystyczne 52
 - 2.5.1. Rozkład normalny 52
 - 2.5.2. Rozkład t 53
 - 2.5.3. Test dwustronny i jednostronny 53
 - 2.5.4. Test istotności t Studenta dla prób niezależnych. Ocena istotności (nieprzydatności) różnic między dwiema średnimi 55

2.5.5. Test istotności t Studenta dla prób zależnych (test sparowany)	57
2.5.6. Test C Cochra i Coxa	58
2.5.7. Porównanie jednorodności wariancji dwóch szeregów statystycznych. Test Fishera–Snedecora	60
2.5.8. Przedział ufności	61
2.6. Współzależności zmiennych	62
2.6.1. Związek korelacyjny. Współczynnik korelacji	62
2.6.2. Wyznaczanie prostej regresji metodą najmniejszych kwadratów	64
2.7. Test zgodności χ^2	70
Piśmiennictwo	72

Część II Niektóre metody fizykochemiczne 73

3. Kolorymetria (A. Zgirski) 74

3.1. Teoretyczne podstawy kolorymetrii	74
3.2. Sposoby obliczania stężeń z odczytanej absorbancji	80
3.2.1. Sposoby obliczania stężeń po wywoływaniu zabarwienia dla jednakowych objętości próby badanej i wzorcowej	80
3.2.2. Sposoby obliczania stężeń po wywoływaniu zabarwienia dla niejednakowych objętości próby badanej i wzorcowej	82
3.2.3. Sposoby obliczania stężeń a stosowanie się rozтворów do prawa Lamberta–Beera	88
Piśmiennictwo	90

4. Chromatografia 91

Wprowadzenie (L. Kłyszewko-Stefanowicz)	91
4.1. Wiadomości podstawowe (L. Kłyszewko-Stefanowicz)	92
4.1.1. Niektóre terminy stosowane w chromatografii	92
4.1.2. Rodzaje chromatografii	93
4.1.3. Metody stosowane w chromatografii	94
4.1.4. Śledzenie przebiegu procesu chromatograficznego	95
4.2. Chromatografia adsorpcyjna (L. Kłyszewko-Stefanowicz)	97
4.2.1. Adsorbenty i rozpuszczalniki	98
4.2.2. Czynniki wpływające na powinowactwo adsorpcyjne	100
4.3. Chromatografia jonowymienna (L. Kłyszewko-Stefanowicz, A. Lipińska)	103
4.3.1. Charakterystyka procesu wymiany jonów	103
4.3.2. Klasyfikacja jonitów	106
4.4. Chromatografia podziałowa (L. Kłyszewko-Stefanowicz, A. Lipińska)	112
4.4.1. Ogólna charakterystyka chromatografii podziałowej	112
4.4.2. Chromatografia podziałowa kolumnowa	114
4.4.3. Chromatografia podziałowa bibułowa	114
4.4.4. Przykłady metod jakościowej oraz ilościowej analizy aminokwasów metodą chromatografii podziałowej bibułowej	122
4.5. Chromatografia cienkowarstwowa	125
4.5.1. Podstawy teoretyczne (E. Majkowska)	125
4.5.2. Technika (E. Majkowska)	126
4.5.3. Przegląd technik chromatografii cienkowarstwowej (E. Majkowska)	131
4.5.4. Chromatografia cienkowarstwowa produktów hydrolizy glutationu oraz niektórych jednocukrów (E. Majkowska)	133
4.5.5. Chromatografia cienkowarstwowa alkaloidów glistnika jaskółczego ziela — <i>Chelidonium majus</i> (H. Urbanek)	136
4.6. Filtracja żelowa (M.T. Schmidt)	137

- 4.6.1. Niektóre sita molekularne 137
 - 4.6.2. Teoria filtracji żelowej 141
 - 4.6.3. Technika pracy na żelach Sephadex 144
 - 4.7. Chromatografia powinowactwa (*Cz.S. Cierniewski, B. Walkowiak*) 147
 - 4.7.1. Podstawy teoretyczne 147
 - 4.7.2. Złoża stosowane w chromatografii powinowactwa 149
 - 4.7.3. Chromatografia kowalencyjna jako szczególny przypadek chromatografii powinowactwa 164
 - 4.7.4. Chromatografia chelatująca jako szczególny przypadek chromatografii powinowactwa 165
 - 4.8. Chromatografia wykorzystująca hydrofobowe właściwości cząsteczek (*Cz.S. Cierniewski, B. Walkowiak*) 166
 - 4.8.1. Podstawy teoretyczne chromatografii oddziaływań hydrofobowych 167
 - 4.8.2. Złoża stosowane w chromatografii oddziaływań hydrofobowych 169
 - 4.8.3. Podstawy teoretyczne chromatografii fazy odwróconej 172
 - 4.8.4. Złoża stosowane w chromatografii fazy odwróconej 174
- Piśmiennictwo 178

5. Elektroforeza w nośnikach 181

- Wprowadzenie (*L. Kłyszewko-Stefanowicz*) 181
- 5.1. Elektroforeza bibułowa (*A. Zgirski*) 182
 - 5.1.1. Wiadomości podstawowe (*A. Zgirski*) 182
 - 5.1.2. Elektroforeza bibułowa białek surowicy (*A. Zgirski*) 184
 - 5.1.3. Elektrochromatograficzny rozdział aminokwasów (*R. Wierzbicki*) 189
 - 5.2. Analiza elektroforetyczna białek w żelu poliakrylamidowym 191
 - 5.2.1. Wiadomości podstawowe (*Z. M. Kiliańska*) 191
 - 5.2.2. Jednowymiarowa elektroforeza histonów w żelu poliakrylamidowym (*A. Lipińska*) 198
 - 5.2.3. Jednowymiarowa elektroforeza białek niehistonowych w żelu poliakrylamidowym (*Z.M. Kiliańska*) 202
 - 5.3. Dwuwymiarowa elektroforeza białek (*Z.M. Kiliańska*) 207
 - 5.4. Analiza białek techniką Western blotting 211
 - 5.4.1. Wiadomości podstawowe (*W.M. Krajewska*) 211
 - 5.4.2. Immunocyflokacja w obecności PAP i AP (*W.M. Krajewska i Z.M. Kiliańska*) 216
 - 5.4.3. Immunocyflokacja glikoprotein (*A. Lipińska*) 220
 - 5.5. Kompleksowa jakościowa i ilościowa analiza jedno- i dwuwymiarowych elektroferogramów (*M. Bryś*) 224
- Piśmiennictwo 228

Część III Analiza podstawowych składników ustrojowych 231

6. Białka 232

- Wprowadzenie (*R. Wierzbicki*) 232
- 6.1. Właściwości białek i aminokwasów (*R. Wierzbicki*) 233
 - 6.1.1. Amfoteryczność białek 233
 - 6.1.2. Białka jako koloidy 238
 - 6.1.3. Rozpuszczalność i wysalanie białek 239
 - 6.1.4. Denaturacja białek 242
 - 6.2. Odczyny barwne na aminokwasy i białka (*R. Wierzbicki*) 245
 - 6.3. Oznaczanie zawartości aminokwasów i białek (*A. Lipińska, R. Wierzbicki*) 246
 - 6.4. Oznaczanie N-końcowego aminokwasu (*A. Lipińska, R. Wierzbicki*) 251
 - 6.5. Oznaczanie C-końcowego aminokwasu (*A. Lipińska*) 257
- Piśmiennictwo 258

7. Cukry i proteoglikany	260
7.1. Jednocukry (monosacharydy) (<i>A. Zgirski</i>)	260
7.1.1. Właściwości fizyczne jednocukrów	260
7.1.2. Właściwości chemiczne jednocukrów	266
7.1.3. Oznaczanie ilościowe jednocukrów	275
7.2. Dwucukry (<i>A. Zgirski</i>)	276
7.3. Wielocukry	280
7.3.1. Homoglikany (<i>A. Zgirski</i>)	280
7.3.2. Glikozaminoglikuronoglikany (kwaśne mukopolisacharydy) (<i>M.T. Schmidt</i>)	283
7.4. Identyfikacja cukrów (<i>H. Łukasiak</i>)	292
7.5. Proteoglikany — struktura chemiczna i właściwości (<i>M.T. Schmidt</i>)	295
Piśmiennictwo	305
8. Lipidy i lipoproteiny	306
8.1. Lipidy (<i>R. Wierzbicki</i>)	306
8.1.1. Podstawowe właściwości fizykochemiczne lipidów	308
8.1.2. Oznaczanie zawartości lipidów w materiale biologicznym	312
8.1.3. Wyodrębnianie i analiza lipidów złożonych	316
8.2. Lipoproteiny i enzymy związane z przemianami lipoprotein (<i>Z.M. Kiliańska</i>)	320
8.2.1. Materiał i metody oznaczania składników lipidowo-białkowych surowicy krwi	324
Piśmiennictwo	331
9. Nukleoproteiny i oznaczanie zawartości kwasów nukleinowych	332
Wprowadzenie	332
9.1. Nukleoproteiny (<i>L. Klyszejko-Stefanowicz, A. Lipińska</i>)	332
9.1.1. Niektóre właściwości nukleoprotein	333
9.1.2. Białka związane z RNA	335
9.1.3. Białka związane z DNA	336
9.1.4. Izolowanie RNP	339
9.1.5. Izolowanie DNP i jego komponentów	341
9.1.6. Ogólna analiza preparatów RNP i DNP	345
9.2. Metody oznaczania zawartości kwasów nukleinowych (<i>Z. Walter</i>)	347
9.2.1. Metoda Schmidta i Thannhausera	348
9.2.2. Metoda Schneidera	350
9.2.3. Metoda Ogura i Rosen	350
9.2.4. Spektrofotometryczna metoda oznaczania kwasów nukleinowych według Tsaneva i Markova	351
Piśmiennictwo	358
10. Kwasy nukleinowe	360
Wprowadzenie (<i>Z. Walter</i>)	360
10.1. Otrzymywanie preparatów kwasów nukleinowych i ogólne zasady ich izolowania (<i>J. Błasiak</i>)	366
10.1.1. Standardowe metody izolowania DNA	369
10.1.2. Izolowanie wysokocząsteczkowego i niskocząsteczkowego DNA	379
10.1.3. Izolowanie RNA	382
10.1.4. Jednoczesne izolowanie RNA i DNA	386
10.2. Badanie właściwości kwasów nukleinowych	389
10.2.1. Niektóre właściwości fizyczne i chemiczne kwasów nukleinowych (<i>J.K. Bartkowiak, R. Wierzbicki</i>)	389

- 10.2.2. Spektrofotometria kwasów nukleinowych (*J.K. Bartkowiak, R. Wierzbicki*) 393
- 10.2.3. Denaturacja DNA (*J. Kulamowicz, R. Oliński*) 398
- 10.2.4. Badanie stopnia spolimeryzowania DNA metodą wiskozymetryczną (*R. Oliński, I. Kulamowicz*) 403
- 10.2.5. Badanie niejednorodności preparatów DNA (*R. Oliński, I. Kulamowicz*) 406
- 10.2.6. Oscylpolarograficzne i pulsopolarograficzne badanie preparatów DNA (*Z. Walter*) 407
- 10.2.7. Analiza składu nukleotydowego (*R. Wierzbicki*) 415
- 10.2.8. Oznaczanie składu nukleozydowego techniką HPLC (*K. Białkowski, R. Oliński*) 420
- 10.3. Analiza ilościowa i strukturalna kwasów nukleinowych 431
 - 10.3.1. Analiza ilościowa kwasów nukleinowych (*J. Błasiak*) 431
 - 10.3.2. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych w analizie DNA (*J. Błasiak*) 435
 - 10.3.3. Elektroforetyczna analiza kwasów nukleinowych w żelu agarozowym i poliakrylamidowym (*J. Błasiak*) 437
 - 10.3.4. Analiza kwasów nukleinowych przez hybrydyzację (*J.K. Bartkowiak*) 452
 - 10.3.5. Analiza kwasów nukleinowych techniką PCR (*J.K. Bartkowiak*) 463
- Piśmiennictwo 468

11. Enzymy 471

- 11.1. Ogólne właściwości enzymów (*A. Zgirski*) 471
- 11.2. Izolowanie i oznaczanie enzymów (*A. Zgirski*) 475
 - 11.2.1. Izolowanie enzymów 475
 - 11.2.2. Oznaczanie aktywności enzymów 476
 - 11.2.3. Rola oznaczania enzymów w diagnostyce klinicznej 480
- 11.3. Kinetyka reakcji enzymatycznych (*A. Zgirski*) 483
 - 11.3.1. Stała i rząd reakcji 483
 - 11.3.2. Stała Michaelisa 489
 - 11.3.3. Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych 496
 - 11.3.4. Wykreślanie danych kinetyki enzymatycznej i wyznaczanie typów inhibicji 503
- 11.4. Badania jakościowe niektórych enzymów (*A. Zgirski*) 520
 - 11.4.1. Oksydoreduktazy (klasa 1) 520
 - 11.4.2. Hydrolazy (klasa 3) 523
- 11.5. Metody oznaczania niektórych enzymów 529
 - 11.5.1. Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) (*A. Zgirski*) 529
 - 11.5.2. Ceruloplazmina (Cp) (*A. Zgirski*) 531
 - 11.5.3. Peroksydazy roślinne (*H. Urbanek*) 541
 - 11.5.4. Rybonukleazy (RNazy) (*Z. Walter*) 544
 - 11.5.5. Aminotransferazy: asparaginianowa (AST) i alaninowa (ALT) (*A. Zgirski*) 549
 - 11.5.6. Acetylocholinoesteraza (AChE) i cholinoesteraza (ChE) (*A. Zgirski*) 554
 - 11.5.7. Hydrolazy monoestrów fosforanowych (fosfatazy zasadowe i kwasowe) (*A. Zgirski*) 556
 - 11.5.8. Proteinazy chromatynowe (*A. Lipińska*) 560
 - 11.5.9. Amylazy (*H. Urbanek, A. Zgirski*) 562
 - 11.5.10. Amoniako-liazy (*H. Urbanek*) 564
- 11.6. Cytochrom *c* (*E. Łoza*) 566
- 11.7. Chlorofil (*H. Urbanek*) 571
- Piśmiennictwo 573

12. Krew 576

- 12.1. Właściwości ogólne krwi (*A. Zgirski, M. Hilewicz-Grabska*) 576
 - 12.1.1. Skład krwi 576
 - 12.1.2. Ciśnienie osmotyczne i hemoliza krwi 576
 - 12.1.3. Pobieranie i odbiałczanie krwi 580
 - 12.1.4. Wykrywanie niektórych składników surowicy 581
 - 12.2. Białka krwi (*A. Zgirski, M. Hilewicz-Grabska*) 582
 - 12.2.1. Hemoglobina — białko erytrocytów 582
 - 12.2.2. Białka surowicy krwi 588
 - 12.2.3. Glikoproteiny (*B. Wachowicz*) 590
 - 12.3. Niebiałkowe składniki organiczne (*A. Zgirski, M. Hilewicz-Grabska*) 592
 - 12.3.1. Mocznik 592
 - 12.3.2. Kwas moczowy 596
 - 12.3.3. Kreatyna i kreatynina 598
 - 12.3.4. Bilirubina 599
 - 12.3.5. Glukoza 603
 - 12.4. Składniki nieorganiczne krwi (*A. Zgirski, M. Hilewicz-Grabska*) 606
 - 12.4.1. Wiadomości ogólne 606
 - 12.4.2. Wapń 607
 - 12.4.3. Żelazo 609
 - 12.4.4. Miedź 612
 - 12.4.5. Chlorki 615
 - 12.4.6. Fosfor 618
 - 12.5. Krzepnięcie krwi (*T. Krajewski, P. Nowak*) 623
 - 12.5.1. Hemostaza ogólna 623
 - 12.5.2. Fibrynogen, struktura, właściwości fizykochemiczne i biologiczne 626
 - 12.5.3. Mechanizm krzepnięcia krwi 629
 - 12.5.4. Fibryno(geno)liza 639
 - 12.5.5. Metody izolowania fibryny(ogenu) oraz badanie ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych 645
 - 12.5.6. Ogólne badanie krzepnięcia krwi 652
 - 12.5.7. Oznaczanie niektórych czynników układu krzepnięcia i fibrynolizy 656
 - 12.6. Płytki krwi, ich aktywacja i udział w hemostazie 665
 - 12.6.1. Charakterystyka płytek krwi (*B. Olas*) 665
 - 12.6.2. Aktywacja płytek krwi (*B. Wachowicz*) 671
 - 12.6.3. Udział płytek krwi w hemostazie (*B. Wachowicz*) 683
- Piśmiennictwo 691

13. Mocz (*A. Zgirski*) 695

- 13.1. Powstawanie moczu 695
 - 13.2. Skład chemiczny moczu 698
 - 13.3. Badanie właściwości fizycznych moczu 700
 - 13.4. Badanie chemiczne moczu prawidłowego 702
 - 13.5. Badanie chemiczne moczu patologicznego 707
 - 13.5.1. Białko 707
 - 13.5.2. Cukier 708
 - 13.5.3. Związki ketonowe 709
 - 13.5.4. Krew 711
 - 13.5.5. Barwniki żółciowe 711
- Piśmiennictwo 712

- 14. Soki trawienne (A. Zgirski) 713**
- 14.1. Trawienie i wchłanianie 713
 - 14.2. Ślina 715
 - 14.2.1. Skład śliny 715
 - 14.2.2. Badanie śliny 716
 - 14.3. Sok żołądkowy 717
 - 14.3.1. Skład soku żołądkowego 717
 - 14.3.2. Badanie soku żołądkowego 719
 - 14.4. Sok trzustkowy 724
 - 14.4.1. Skład soku trzustkowego 724
 - 14.4.2. Badanie soku trzustkowego 726
 - 14.5. Sok jelitowy 728
 - 14.5.1. Skład soku jelitowego 728
 - 14.5.2. Badanie soku jelitowego 729
 - 14.6. Żółć 730
 - 14.6.1. Skład i znaczenie żółci 730
 - 14.6.2. Badanie żółci 732
- Piśmiennictwo 732

Część V Izolowanie i analiza niektórych struktur komórkowych 733

- 15. Frakcjonowanie morfologiczne komórki 734**
- 15.1. Zarys ultrastruktury i frakcjonowanie komórki (*L. Klyszejko-Stefanowicz*) 734
 - 15.2. Przykładowe izolowanie podstruktur komórkowych z nukleoplastu i cytoplastu 740
 - 15.2.1. Otrzymywanie jąderek (*A. Lipińska*) 740
 - 15.2.2. Otrzymywanie błon aparatu Golgiego (*M. Hilewicz-Grabska*) 742
- Piśmiennictwo 745
- 16. Jądro komórkowe 746**
- 16.1. Izolowanie jąder komórkowych (*Z.M. Kiliańska*) 746
 - 16.2. Hydrolaza glukozy-6-fosforanowa (EC 3.1.3.9) — enzym znacznikowy siateczki śródplazmatycznej (*A. Lipińska*) 751
 - 16.3. Chromatyna (*A. Lipińska*) 753
 - 16.4. Frakcjonowanie jąder komórkowych 756
 - 16.4.1. Enzymatyczne frakcjonowanie jąder komórkowych (*W. M. Krajewska*) 756
 - 16.4.2. Frakcjonowanie jąder komórkowych z wydzieleniem matriksu jądrowego (*Z. M. Kiliańska*) 759
- Piśmiennictwo 763
- 17. Mitochondria (*Z.M. Kiliańska*) /765**
- Piśmiennictwo 767
- 18. Różnicowanie komórkowe na przykładzie czerwonych krwinek ptaków i ssaków (*W. M. Krajewska*) 768**
- Piśmiennictwo 774
- 19. Dodatek (*R. Wierzbicki, A. Zgirski*) /775**