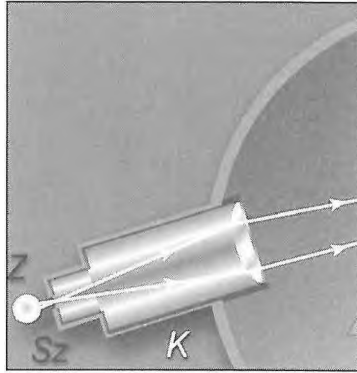


Biofizyka

Wybrane
zagadnienia
wraz z ćwiczeniami

Redakcja naukowa
Zofia Józwiak
Grzegorz Bartosz

Biofizyka



Wybrane
zagadnienia
wraz z ćwiczeniami

Redakcja naukowa

Zofia Józwiak

Grzegorz Bartosz



WYDAWNICTWO NAUKOWE PWN
WARSZAWA 2008

Spis treści

1.	Statystyczna ocena wyników pomiarów	15
1.1.	Wprowadzenie. Pojęcie pomiaru (<i>B. Rychlik</i>)	15
1.1.1.	Jednostki miar układu SI.	15
1.1.1.1.	Jednostki podstawowe.	16
1.1.1.2.	Jednostki pochodne.	16
1.1.2.	Dziesiętne wielokrotności i podwielokrotności jednostek miar	18
1.1.3.	Jednostki miar spoza układu SI	18
1.2.	Analiza błędów pomiarowych	20
1.2.1.	Rodzaje i źródła błędów pomiarowych	20
1.2.2.	Określanie niepewności pomiarowej	20
1.2.2.1.	Określanie niepewności pomiarowej wielkości mierzonej bezpośrednio	21
1.2.2.2.	Określanie niepewności pomiarowej przy pomiarach pośrednich	21
1.3.	Współzależność cech; korelacja i regresja liniowa (<i>B. Rychlik</i>)	22
1.4.	Zmienna losowa, rozkłady zmiennej losowej (<i>B. Rychlik</i>)	24
1.5.	Kryteria oceny metod analitycznych (<i>M. Puchala</i>)	25
1.6.	Ćwiczenia. Rozkłady zmiennych losowych: Gaussa i Poissona (<i>B. Rychlik</i>)	28
	Literatura	29
2.	Ćwiczenia wprowadzające do biofizyki	30
2.1.	Gęstość ciał stałych i cieczy (<i>M. Soszyński</i>)	30
2.1.1.	Wyznaczanie gęstości ciał stałych i cieczy za pomocą wagi hydrostatycznej	32
2.1.2.	Wyznaczanie gęstości względnej cieczy za pomocą piknometru	34
2.1.3.	Wyznaczanie gęstości cieczy za pomocą areometru	35
2.1.4.	Wyznaczanie gęstości płynów biologicznych metodą pomiaru prędkości opadania kropli	35
2.2.	Elementy akustyki i ruch falowy (<i>M. Soszyński</i>)	37
2.2.1.	Wyznaczanie prędkości rozchodzenia się dźwięku w ciele stałym za pomocą rury Kundta	41
2.2.2.	Wyznaczanie częstości drgań widełek stroikowych metodą Quinckego	41
2.3.	Wilgotność względna i bezwzględna powietrza (<i>M. Soszyński</i>)	42
	Zasada działania psychrometru.	43
2.4.	Kalorymetria (<i>M. Soszyński</i>)	45
2.4.1.	Wyznaczanie ciepła topnienia lodu	46
2.4.2.	Wyznaczanie współczynnika rozszerzalności objętościowej cieczy za pomocą piknometru	48
2.4.3.	Wyznaczanie ilości ciepła wydzielanego z organizmu człowieka przy oddychaniu	49
2.5.	Zjawisko termoelektryczne. Wyznaczanie temperatury za pomocą termopary (<i>M. Soszyński</i>)	50
2.6.	Pomiar oporu elektrycznego i siły elektromotorycznej (<i>M. Soszyński</i>)	53
2.6.1.	Pomiar oporu elektrycznego przewodnika w układzie mostka Wheatstone'a	53
2.6.2.	Pomiar siły elektromotorycznej (SEM) ogniwa metodą kompensacji	55
2.7.	Oscyloskop katodowy (<i>M. Soszyński</i>)	57
2.8.	Warstwa monomolekularna (<i>M. Koter-Michalak</i>)	60

Literatura	62
3. Termodynamika	63
3.1. Podstawowe pojęcia termodynamiki klasycznej (<i>M. Bryszewska</i>)	63
3.1.1. Pojęcie układu, parametry układu, stan układu	63
3.1.2. Pierwsza zasada termodynamiki; funkcje stanu	64
3.1.3. Druga zasada termodynamiki; procesy odwracalne i nieodwracalne. Entropia, entalpia swobodna	65
3.1.4. Entalpia swobodna reakcji chemicznych	67
3.1.5. Zadania rachunkowe z termodynamiki (<i>M. Przybylska</i>)	70
3.2. Ćwiczenia	79
3.2.1. Entalpia swobodna reakcji dysocjacji <i>p</i> -nitrofenolu (<i>M. Koter-Michalak</i>)	79
3.2.2. Entalpia swobodna oddziaływania ligandu z błoną komórkową. Wykres Scatcharda (<i>A. Marczak</i>)	80
3.2.3. Wyznaczanie E_0' układu oksyhemoglobina/methemoglobina (<i>A. Marczak</i>)	83
3.2.4. Wyznaczanie współczynnika odbicia (<i>A. Marczak</i>)	86
3.2.5. Wyznaczanie mechanicznego współczynnika filtracji (<i>M. Koter-Michalak</i>).	88
Literatura	90
4. Spektrofotometria	91
4.1. Podstawy spektroskopii UV-Vis (<i>K. Gwoździński, A. Koceva-Chyla</i>)	91
4.1.1. Charakterystyka promieniowania elektromagnetycznego i jego oddziaływania z materią	91
4.1.2. Wiązania chemiczne w cząsteczkach	93
4.1.3. Przejścia elektronowe w cząsteczkach	96
4.1.4. Wpływ polarności rozpuszczalnika na widma UV	103
4.1.5. Prawa absorpcji promieniowania elektromagnetycznego i ich zastosowanie	105
4.1.6. Odchylenia od prawa Bouguera–Lamberta–Beera	109
4.1.7. Zastosowanie spektrofotometrii UV-Vis	112
4.2. Budowa i ogólna zasada działania spektrofotometrów UV-Vis (<i>M. Puchala</i>)	114
4.2.1. Podział spektrofotometrów	118
4.2.2. Parametry charakteryzujące spektrofotometry	119
4.3. Ćwiczenia	120
4.3.1. Prawo Bouguera–Lamberta–Beera. Wyznaczanie współczynników absorpcji (<i>M. Puchala, A. Krokosz</i>)	120
4.3.2. Spektrofotometryczne oznaczanie stężenia związku w mieszaninie dwuskładnikowej. Prawo addytywności absorpcji (<i>M. Puchala, A. Krokosz</i>).	121
4.3.3. Widma absorpcyjne różnych form hemoglobiny. Spektrofotometr dwuwiązkowy w zakresie UV-Vis (<i>M. Puchala, A. Krokosz</i>)	123
4.3.4. Kinetyka reakcji utleniania hemoglobiny. Aktywność katalazy (<i>M. Puchala, A. Krokosz</i>)	128
4.3.5. Wpływ różnych czynników na widma w zakresie UV-Vis (<i>K. Gwoździński</i>)	130
Literatura	131
5. Zastosowanie znaczników fluorescencyjnych w badaniach błon biologicznych	132
5.1. Ogólna charakterystyka znaczników fluorescencyjnych (<i>M. Bryszewska</i>).	132
5.1.1. Przykłady najważniejszych znaczników fluorescencyjnych	133
5.1.2. Procesy fizyczne zachodzące w cząsteczce znacznika po pochłonięciu przez nią fotonu	135
5.1.2.1. Absorpcja i fluorescencja	135
5.1.2.2. Polaryzacja fluorescencji	136
5.1.2.3. Gaszenie fluorescencji	139
5.1.3. Aparatura i pomiar fluorescencji znaczników	140
5.2. Badanie fizycznej struktury błon biologicznych za pomocą znaczników fluorescencyjnych (<i>M. Bryszewska</i>)	141
5.2.1. Oddziaływanie znaczników z błonami	141
5.2.2. Lokalizacja znaczników w błonach	142
5.2.3. Badanie ładunku powierzchniowego błon	143
5.2.4. Badanie ruchów cząsteczek w błonach	144
5.2.4.1. Badanie dyfuzji rotacyjnej w błonach	144
5.2.4.2. Badanie dyfuzji lateralnej w błonach	146

5.2.5.	Badanie oddziaływań białkowo-lipidowych w błonach	148
5.2.6.	Wyniki wybranych badań zmian błon komórkowych w stanach patologicznych przy użyciu znaczników fluorescencyjnych	150
5.3.	Ćwiczenia	151
5.3.1.	Ogólna budowa i zasada działania spektrofluorymetru (<i>M. Puchala</i>)	151
5.3.2.	Charakterystyka spektralna związków fluoryzujących w zakresie UV-Vis (<i>M. Puchala</i>)	152
5.3.3.	Fluorymetryczne oznaczanie zawartości tryptofanu w białkach (<i>M. Przybylska, M. Puchala</i>)	155
5.3.4.	Analiza dyfuzji lateralnej pirenenu w błonach komórkowych krwinek czerwonych (<i>M. Przybylska</i>)	157
5.3.5.	Badanie wpływu wybranych związków chemicznych na mikrolepkość błony komórkowej erytrocytów metodą pomiaru współczynnika anizotropii fluorescencji TMA-DPH (<i>M. Przybylska</i>)	158
5.3.6.	Oznaczanie potencjału błonowego krwinek czerwonych metodą fluorymetryczną (<i>M. Przybylska</i>)	161
5.3.7.	Badanie szybkości transportu doksorubicyny przez błony komórkowe erytrocytów (<i>M. Przybylska</i>)	164
5.3.8.	Wyznaczanie parametru wiązania znacznika fluorescencyjnego 1-anilinonaftaleno-8-sulfonianu z błoną komórkową krwinek czerwonych (<i>M. Przybylska</i>)	166
5.3.9.	Wyznaczanie szybkości akumulacji daunorubicyny w błonach komórkowych fibroblastów metodą transferu energii (<i>M. Przybylska</i>)	169
	Literatura	171
6.	Spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)	173
6.1.	Podstawy spektroskopii EPR (<i>K. Gwoździński, M. Koter-Michalak</i>)	174
6.2.	Rodniki nitroksylowe w metodzie znakowania spinowego (<i>K. Gwoździński</i>)	178
6.3.	Metoda pułapkowania spinowego (<i>K. Gwoździński</i>)	186
6.4.	Widma znaczników spinowych przyłączonych do lipidów i białek (<i>K. Gwoździński, M. Koter-Michalak</i>)	188
6.5.	Budowa spektrometrów EPR (<i>K. Gwoździński</i>)	195
6.6.	Ćwiczenia	197
6.6.1.	Dobór niektórych parametrów związanych z rejestracją widm EPR (<i>K. Gwoździński</i>)	197
6.6.2.	Wyznaczanie podstawowych parametrów widma EPR (<i>K. Gwoździński</i>)	198
6.6.3.	Wpływ polarności oraz lepkości rozpuszczalników na widmo EPR (<i>K. Gwoździński</i>)	199
6.6.4.	Badanie szybkości redukcji związków znakowanych spinowo w erytrocytach (<i>K. Gwoździński</i>)	200
6.6.5.	Wyznaczanie energii aktywacji procesu redukcji nitroksydu we wnętrzu erytrocytów (<i>K. Gwoździński</i>)	201
6.6.6.	Badania zmian konformacyjnych białek błonowych przy użyciu znacznika maleimidowego (<i>K. Gwoździński</i>)	203
6.6.7.	Denaturacja termiczna znakowanej spinowo albuminy (<i>K. Gwoździński, G. Bartosz</i>)	204
6.6.8.	Wyznaczanie parametru widmowego Tempo dla sztucznych błon fosfolipidowych (<i>M. Koter-Michalak</i>)	205
6.6.9.	Badanie wpływu etanolu na stopień uporządkowania lipidów błony erytrocytarnej (<i>M. Koter-Michalak</i>)	206
6.6.10.	Wyznaczanie mikrolepkości wnętrza erytrocytu (<i>M. Koter-Michalak</i>)	207
6.6.11.	Badanie wolnych rodników w materiale biologicznym (<i>M. Koter-Michalak</i>)	208
	Literatura	209
7.	Inne metody spektroskopowe	210
7.1.	Turbidymetria i nefelometria (<i>A. Koceva-Chyła</i>)	210
7.1.1.	Podstawy teoretyczne	210
7.1.2.	Ćwiczenia	214
7.1.2.1.	Turbidymetryczne oznaczenie stężenia komórek (<i>A. Koceva-Chyła</i>)	214
7.1.2.2.	Wyznaczanie przebiegu hemolizy krwinek na podstawie pomiaru zmian turbidancji (<i>A. Koceva-Chyła</i>)	215
7.2.	Polarymetria (<i>A. Koceva-Chyła, M. Puchala</i>)	216
7.2.1.	Podstawy teoretyczne	216
7.2.1.1.	Światło niespolaryzowane	216

7.2.1.2.	Polaryzacja światła, światło spolaryzowane	217
7.2.1.3.	Sposoby polaryzacji światła.	219
7.2.1.4.	Polaryzatory i analizatory światła.	222
7.2.1.5.	Skreńcenie płaszczyzny polaryzacji przez substancje optycznie czynne	225
7.2.1.6.	Dichroizm kołowy (<i>M. Puchala, A. Krokosz</i>)	227
7.2.1.7.	Dyspersja skrećalności optycznej i dichroizm kołowy (<i>M. Puchala, A. Krokosz</i>)	228
7.2.1.8.	Skrećalność właściwa.	229
7.2.1.9.	Oznaczanie kąta skrećenia płaszczyzny polaryzacji	230
7.2.1.10.	Polarymetry — rodzaje i budowa.	230
7.2.1.11.	Zasada pomiaru kąta skrećenia płaszczyzny polaryzacji w polarymetrze kołowym	231
7.2.2.	Budowa i zasada działania polarymetru automatycznego POLAMAT A (<i>A. Krokosz</i>)	233
7.2.3.	Ćwiczenia.	235
7.2.3.1.	Polarymetryczne oznaczenie stężenia i skrećalności właściwej sacharozy (<i>A. Koceva-Chyla</i>)	235
7.2.3.2.	Aktywność optyczna aminokwasów i białek (<i>M. Puchala, A. Krokosz</i>)	236
7.3.	Refraktometria (<i>A. Koceva-Chyla</i>)	237
7.3.1.	Podstawy teoretyczne	237
7.3.1.1.	Zjawiska odbicia i załamania światła w ośrodkach izotropowych	237
7.3.1.2.	Zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia, kąt graniczny	240
7.3.1.3.	Czynniki wpływające na wartość współczynnika załamania światła	241
7.3.1.4.	Refrakcja molowa, refrakcja właściwa i cząstalcza	243
7.3.1.5.	Zastosowanie pomiaru kąta granicznego w refraktometrii	245
7.3.1.6.	Refraktometry — budowa i zasada działania.	245
7.3.2.	Ćwiczenia.	247
7.3.2.1.	Wyznaczenie zależności pomiędzy stężeniem a współczynnikiem załamania światła roztworów alkoholu etylowego i alkoholu metylowego (<i>A. Koceva-Chyla</i>)	247
7.3.2.2.	Wyznaczenie stężenia białka w osoczu krwi metodą refraktometryczną (<i>A. Koceva-Chyla</i>)	249
	Literatura	250
8.	Potencjometria i konduktometria	251
8.1.	Potencjometria (<i>A. Fortuniak</i>)	251
8.1.1.	Elektrody.	251
8.1.1.1.	Elektroda wodorowa.	252
8.1.1.2.	Elektrody pierwszego rodzaju	252
8.1.1.3.	Elektrody drugiego rodzaju	253
8.1.1.4.	Elektrody trzeciego rodzaju	254
8.1.1.5.	Elektrody redoks.	254
8.1.1.6.	Elektrody tlenkowe	255
8.1.1.7.	Elektrody jonoselektywne	255
8.1.1.7.1.	Elektrody membranowe krystaliczne	256
8.1.1.7.2.	Elektrody membranowe heterogenne	257
8.1.1.7.3.	Elektrody membranowe z ciekłym wymiennikiem	257
8.1.1.7.4.	Elektrody enzymatyczne.	257
8.1.2.	Zastosowanie pomiarów potencjometrycznych	257
8.1.2.1.	Pomiar pH.	257
8.1.2.2.	Miareczkowanie potencjometryczne	258
8.1.2.2.1.	Miareczkowanie metodą klasyczną	258
8.1.2.2.2.	Miareczkowanie do punktu zerowego	259
8.1.2.2.3.	Miareczkowanie metodą różnicową	259
8.1.2.2.4.	Miareczkowanie z dwumetalicznym układem elektrod.	260
8.1.3.	Zastosowanie pomiarów potencjometrycznych do wyznaczania stałych fizykochemicznych	260
8.2.	Konduktometria (<i>A. Fortuniak</i>)	261
8.2.1.	Zastosowanie pomiarów konduktometrycznych	262
8.2.1.1.	Miareczkowanie konduktometryczne.	262

8.2.1.2.	Miareczkowanie alkacymetryczne	263
8.2.1.3.	Miareczkowanie strąceniowe	264
8.2.2.	Konduktometria bezpośrednia	264
8.2.3.	Zastosowanie pomiarów konduktometrycznych	265
8.2.3.1.	Wyznaczanie stałej dysocjacji	265
8.2.3.2.	Wyznaczanie iloczynu rozpuszczalności	265
8.3.	Ćwiczenia	266
8.3.1.	Jonowe właściwości aminokwasów pH-metryczne wyznaczenie pK glicyny (<i>A. Marczak</i>)	266
8.3.2.	Miareczkowanie kwasu ortofosforowego pH-metrycznie i wobec wskaźników pH (<i>A. Marczak</i>)	269
8.3.2.1.	Miareczkowanie wobec wskaźników	270
8.3.2.2.	Miareczkowanie pH-metryczne	271
8.3.3.	Wyznaczanie przewodności elektrycznej erytroplazmy (<i>M. Koter-Michalak</i>)	271
	Literatura	272
9.	Wiskozymetria	273
9.1.	Lepkość biopolimerów (<i>K. Gwoździński</i>)	273
9.1.1.	Lepkość, wiadomości ogólne	273
9.1.2.	Makrocząsteczka podczas przepływu	276
9.1.3.	Pomiary lepkości	280
9.2.	Ćwiczenia	283
9.2.1.	Wyznaczanie współczynnika lepkości metodą Stokesa (<i>M. Soszyński</i>)	283
9.2.2.	Pomiar lepkości względnej cieczy przy użyciu wiskozymetru kapilarnego (<i>M. Soszyński</i>)	284
9.2.3.	Zastosowanie pomiarów lepkości do wyznaczania masy cząsteczkowej polimeru (<i>K. Gwoździński</i>)	285
	Literatura	287
10.	Wirowanie	288
10.1.	Wirówki (<i>M. Puchata</i>)	288
10.2.	Ultrawirówki (<i>K. Gwoździński</i>)	292
10.3.	Określanie mas cząsteczkowych metodą szybkości sedimentacji (<i>K. Gwoździński</i>)	294
10.4.	Wyznaczanie mas cząsteczkowych metodą równowagi sedimentacyjnej (<i>K. Gwoździński</i>)	299
10.5.	Sedymentacja w gradencie gęstości (<i>K. Gwoździński</i>)	302
10.6.	Równowaga sedimentacyjna w ustalonym gradencie (<i>K. Gwoździński</i>)	306
10.7.	Ćwiczenia	308
10.7.1.	Wirowanie — ćwiczenie wstępne (<i>A. Krokosz</i>)	308
10.7.2.	Termiczna denaturacja białka (<i>M. Puchata</i>)	309
10.7.3.	Rozdział lipoprotein osocza metodą ultrawierowania (<i>K. Gwoździński</i>)	310
10.7.4.	Rozdział mieszaniny kwasów rybonukleinowych metodą wirowania w gradencie gęstości sacharozy (<i>K. Gwoździński</i>)	312
10.7.5.	Oznaczanie pojedynczych pęknięć w DNA metodą ultrawierowania w gradencie sacharozy alkalicznej (<i>B. Różga</i>)	314
10.7.6.	Oznaczanie superhelikalności nukleoidu DNA metodą ultrawierowania w gradencie sacharozy neutralnej (<i>B. Różga</i>)	319
	Literatura	323
11.	Elektroforeza	324
11.1.	Ogólne zasady (<i>G. Zaleśna</i>)	324
11.1.1.	Próbka	325
11.1.2.	Bufory	325
11.1.3.	Elektroendoosmoza	326
11.1.4.	Zastosowanie metody	326
11.2.	Ćwiczenia	327
11.2.1.	Rozdział białek surowicy krwi człowieka na acetylocelulozie (<i>W. Duda, G. Zaleśna</i>)	327
11.2.2.	Rozdział białek surowicy ludzkiej metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (<i>G. Zaleśna</i>)	328
11.2.3.	Oznaczanie masy cząsteczkowej białek metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS (wg Weber i Osborn, 1969) (<i>G. Zaleśna</i>)	330
11.2.4.	Oznaczanie punktu izoelektrycznego białek metodą ogniskowania izoelektrycznego (<i>G. Zaleśna</i>)	332

Literatura	334
12. Chromatografia	335
12.1. Podstawy teoretyczne, zastosowanie metody (<i>K. Gwoździński</i>)	335
12.1.1. Chromatografia adsorpcyjna (<i>K. Gwoździński</i>)	336
12.1.1.1. Izotermy adsorpcji	338
12.1.1.2. Czynniki wpływające na rozdział chromatograficzny	340
12.1.1.3. Monitorowanie rozdziału w chromatografii kolumnowej	342
12.1.2. Chromatografia podziałowa (<i>K. Gwoździński</i>)	344
12.1.3. Chromatografia bibułowa (<i>K. Gwoździński</i>)	344
12.1.3.1. Identyfikacja chromatogramów.	345
12.1.3.2. Zależność między współczynnikiem R_f a budową substancji	346
12.1.4. Chromatografia cienkowarstwowa (<i>K. Gwoździński</i>)	347
12.1.5. Filtracja żelowa (<i>K. Gwoździński</i>)	348
12.1.5.1. Złoże stosowane w chromatografii żelowej.	349
12.1.5.2. Współczynniki podziału w chromatografii żelowej	350
12.1.5.3. Charakterystyka pasm i parametry kolumny chromatograficznej	351
12.1.5.4. Oznaczanie mas cząsteczkowych metodą chromatografii żelowej	354
12.1.6. Chromatografia jonowymienna (<i>K. Gwoździński</i>)	355
12.1.6.1. Rodzaje wymiennicy jonowych	355
12.1.6.2. Parametry charakteryzujące wymiennicze jonowc.	356
12.1.6.3. Bufory stosowane w chromatografii jonowymiennej	357
12.1.6.4. Zastosowania chromatografii jonowymiennej.	359
12.1.7. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>K. Gwoździński</i>)	359
12.1.8. Chromatografia gazowa	363
12.2. Ćwiczenia	367
12.2.1. Zastosowanie metody filtracji żelowej do oznaczania masy cząsteczkowej białka (<i>K. Gwoździński</i>)	367
12.2.2. Oznaczanie stężenia adduktu MDA-TBA metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej HPLC (<i>K. Gwoździński</i>)	370
12.2.3. Rozdział barwników roślinnych za pomocą kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej (<i>K. Gwoździński</i>)	371
12.2.4. Rozdział substancji z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej (<i>K. Gwoździński</i>)	372
Literatura	373
13. Biofizyka białek	374
13.1. Ogólne informacje o białkach (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	374
13.2. Właściwości funkcjonalne i fizykochemiczne hemoglobiny	375
13.3. Ćwiczenia	378
13.3.1. Otrzymywanie i oznaczanie stężenia hemoglobiny (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	378
13.3.2. Oznaczanie krzywej dysocjacji tlenowej hemoglobiny metodą spektrofotometryczną (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	379
13.3.3. Efekt Bohra (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	381
13.3.4. Oznaczenie granicznej liczby lepkościowej $[\eta]$ roztworów hemoglobiny natywnej i zdenaturowanej (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	382
13.3.5. Badanie stabilności methemoglobiny (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	385
13.3.5.1. Otrzymywanie methemoglobiny (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	385
13.3.5.2. Oznaczanie stabilności MetHb w środowisku kwaśnym oraz w obecności mocznika i chlorowodorku guanidyny (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	386
13.3.5.3. Oznaczenie szybkości denaturacji MetHb w moczniku i chlorowodorku guanidyny (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	386
13.3.5.4. Wyznaczanie energii aktywacji dla procesu denaturacji MetHb w środowisku kwaśnym (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	387
13.3.5.5. Wyznaczanie pK methemoglobiny (<i>D. Pałecz</i>)	388
13.4. Charakterystyka dysmutazy ponadtlenkowej (<i>G. Zalesna</i>)	391
13.4.1. Izolowanie dysmutazy ponadtlenkowej z wątroby wieprzowej	391
13.4.2. Charakterystyka białka enzymatycznego.	392
13.4.2.1. Oznaczanie białka	393

13.4.2.2. Metoda barwienia żeli na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej	393
13.4.2.3. Metoda pirogallolowa oznaczania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej.	394
Literatura	394
14. Biofizyka błon	395
14.1. Błony biologiczne (<i>M. Bryszewska</i>)	395
14.1.1. Skład lipidowy błon	396
14.1.2. Asymetria lipidów błonowych	398
14.1.3. Oddziaływania międzycząsteczkowe	398
14.1.4. Płynność błony	399
14.1.5. Ruchy cząsteczkowe w dwuwarstwie lipidowej.	400
14.1.6. Białka błonowe	402
14.1.7. Transport przez błony.	404
14.2. Ćwiczenia	405
14.2.1. Wyznaczenie współczynnika przenikania (<i>D. Palecz</i>)	405
14.2.2. Oporność osmotyczna erytrocytów (<i>D. Palecz</i>)	407
14.2.3. Energia aktywacji procesu hemolizy (<i>D. Palecz</i>)	411
14.2.3.1. Turbidymetryczny pomiar energii aktywacji procesu hemolizy	412
14.2.3.2. Absorpcyjometryczny pomiar energii aktywacji procesu hemolizy	412
14.2.4. Izolowanie błon erytrocytarnych i charakterystyka chemiczna otrzymanego preparatu (<i>A. Marczak</i>)	413
14.2.4.1. Izolowanie błon erytrocytarnych	413
14.2.4.2. Ekstrakcja lipidów z błon erytrocytarnych (<i>Vaskovsky i wsp., 1975</i>)	414
14.2.4.3. Charakterystyka chemiczna otrzymanych błon erytrocytarnych	415
14.2.4.3.1. Oznaczenie zawartości białka	416
14.2.4.3.2. Oznaczenie zawartości hemoglobiny.	416
14.2.4.3.3. Identyfikacja i oznaczenie ilościowe fosfolipidów błon erytrocytarnych	416
14.2.4.3.4. Oznaczenie zawartości cholesterolu	417
14.2.4.4. Opracowanie wyników	417
14.2.5. Otrzymywanie liposomów z lecytyny jaja kurzego i badanie ich przepuszczalności dla chromianu (<i>D. Palecz</i>)	417
14.2.6. Wyznaczenie szybkości transportu 2,4-dinitrofenyloglutationu z erytrocytów człowieka (<i>M. Soszyński</i>)	419
Literatura	422
15. Wolne rodniki, antyutleniacze oraz uszkodzenia lipidów, białek i kwasów nukleinowych	423
15.1. Powstawanie wolnych rodników (<i>M. Gwoździński</i>)	423
15.2. Reakcje wolnych rodników (<i>M. Gwoździński</i>)	426
15.3. Wolne rodniki w biologii i medycynie (<i>M. Gwoździński</i>)	428
15.3.1. Powstawanie wolnych rodników <i>in vivo</i>	428
15.3.2. Udział czynników zewnętrznych w generowaniu aktywnych form tlenu	432
15.4. Komórkowe i tkankowe systemy ochronne przeciw aktywnym formom tlenu (<i>M. Gwoździński</i>)	437
15.5. Wolne rodniki w patologii (<i>M. Gwoździński</i>)	444
15.5.1. Utlenianie i modyfikacja lipidów	444
15.5.2. Utlenianie i modyfikacja białek	447
15.5.3. Utlenianie kwasów nukleinowych	451
15.6. Ćwiczenia	452
15.6.1. Oznaczenie stężenia zredukowanego glutationu w erytrocytach poddanych działaniu H ₂ O ₂ (<i>A. Marczak, K. Rękawiecka</i>)	452
15.6.2. Oznaczenie rodników hydroksylowych HO [•] w układach biologicznych (<i>Z. Szweda-Lewandowska</i>)	454
15.6.2.1. Analiza degradacji deoksyrybozy przez układy generujące rodniki HO [•]	454
15.6.2.2. Oznaczenie stałych szybkości reakcji rodników HO [•]	456
15.6.3. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej płynów biogennych (<i>G. Batrosz</i>)	457
15.6.3.1. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie hamowania utleniania ABTS	458
15.6.3.2. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie hamowania utleniania 2',7'-dichlorofluorescyny	460

15.6.3.3. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie redukcji jonów żelazowych	460
15.6.3.4. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie redukcji kationorodnika ABTS ⁺	461
15.6.4. Pułapkowanie spinowe (<i>K. Gwoździński</i>)	463
15.6.4.1. Pułapkowanie rodnika HO [•] przy użyciu DMPO	463
15.6.4.2. Pułapkowanie rodnika O ₂ [•] przy użyciu DMPO	464
15.6.4.3. Pułapkowanie rodników O ₂ ^{-•} i HO [•] w pobudzonych neutrofilach.	465
15.6.4.4. Pułapkowanie rodnika HO [•] przy użyciu PBN	466
Literatura	467
16. Metody stosowane w badaniach apoptozy w komórkach (<i>Z. Józwiak</i>)	468
16.1. Apoptoza — wprowadzenie	468
16.1.1. Rola białka p53	469
16.1.2. Rodzina białek Bcl-2	469
16.1.3. Struktura i funkcja kaspaz.	471
16.1.4. Mechanizmy indukcji apoptozy	472
16.2. Ćwiczenia	474
16.2.1. Oznaczanie zmian apoptotycznych w komórkach za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego	474
16.2.2. Oznaczanie potencjału błony mitochondrialnej	476
16.2.3. Oznaczanie reaktywnych form tlenu w hodowlach komórkowych	479
16.2.4. Oznaczanie wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w fibroblastach	483
16.2.5. Oznaczanie aktywności kaspazy 3 w komórkach apoptotycznych.	484
16.2.6. Oznaczanie uszkodzeń DNA metodą kometową.	487
16.2.7. Oznaczanie fragmentacji DNA w żelu agarozowym	489
Literatura	492
17. Cytometria przepływową (<i>J. Skierski</i>)	494
17.1. Wprowadzenie	494
17.2. Ćwiczenia	501
17.2.1. Utrwalanie komórek w alkoholu etylowym	501
17.2.2. Oznaczanie zawartości kwasów nukleinowych DNA i RNA przy użyciu barwienia oranżem akrydyny.	502
17.2.3. Oznaczanie indeksu mitotycznego przy użyciu metody kwaśnej denaturacji DNA i barwienia oranżem akrydyny.	504
17.2.4. Oznaczanie odsetka komórek żywych i martwych przy użyciu diocetanu fluoresceiny i jodku propidyny	509
17.2.5. Oznaczanie odsetka komórek apoptotycznych przy użyciu barwienia aneksyną V i jodkiem propidyny.	510
17.2.6. Oznaczanie zawartości DNA i białek cytoplazmatycznych w komórkach po zabarwieniu DAPI i sulforodaminą	513
17.2.7. Wyznaczanie odsetka subpopulacji limfocytów przy użyciu zestawu przeciwciał monoklonalnych simultest firmy Becton-Dickinson	519
Literatura	524
18. Zastosowanie laserów w biologii i medycynie	525
18.1. Generowanie promieniowania laserowego (<i>J. Kujawa</i>)	525
18.2. Oddziaływanie promieniowania laserowego z tkanką biologiczną (<i>J. Kujawa</i>)	528
18.3. Ćwiczenia	531
18.3.1. Określanie stopnia hemolizy krwinek czerwonych poddawanych naświetlaniu promieniowaniem laserowym po inkubacji z ftalocjaninami (<i>E. Krajewska, D. Patecz</i>)	531
18.3.2. Pomiar aktywności acetylocholinoesterazy erytrocytarnej poddanej działaniu promieniowania laserowego (<i>M. Sadowska</i>)	534
Literatura	535
Tablice	537
Indeks	551