

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА БИОХЕМИЈА

ВОВЕД

БИОХЕМИЈА - ХЕМИЈА НА ЖИВИТЕ КЛЕТКИ

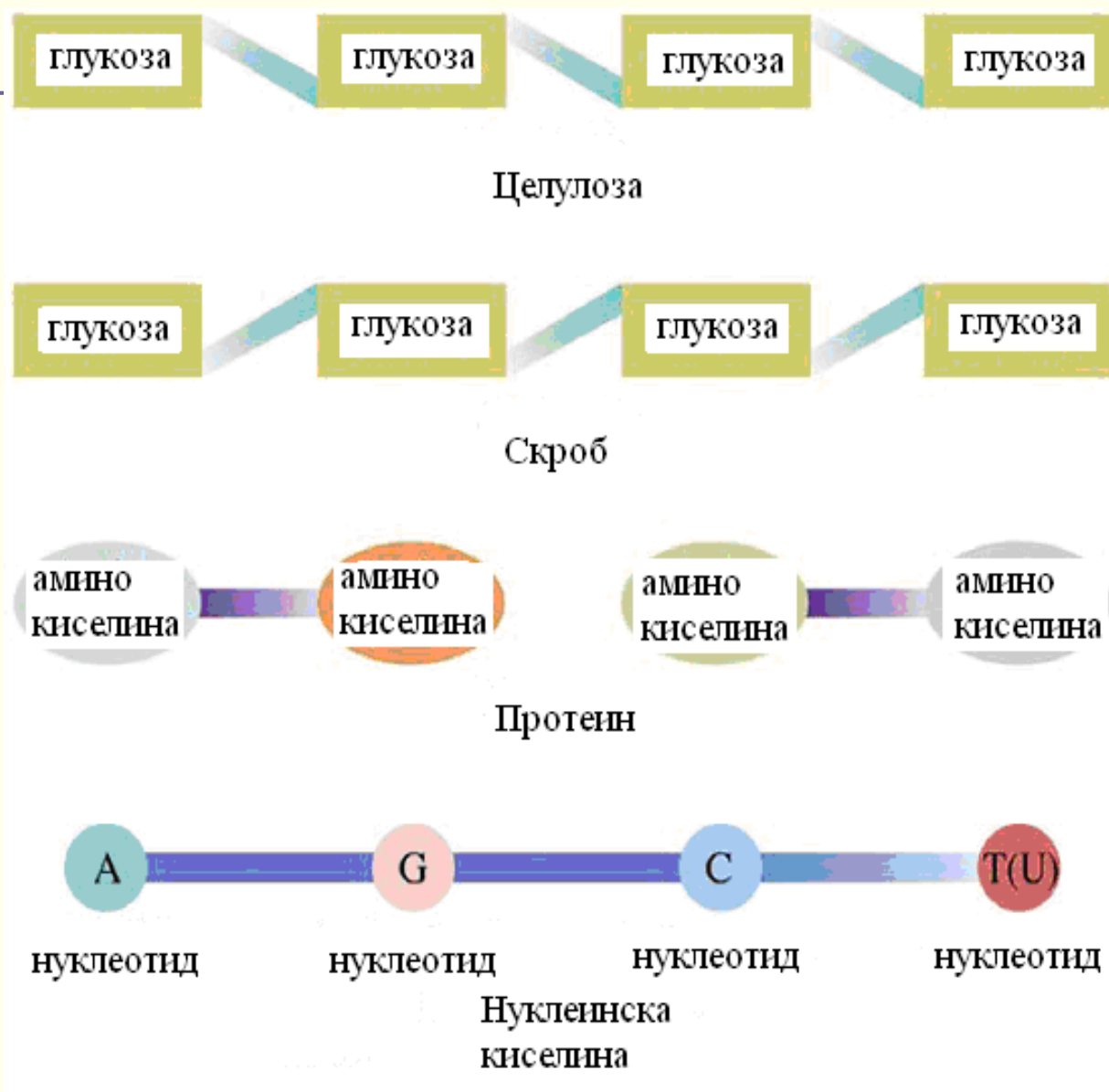
- **ЦЕЛ:** да се објаснат процесите во клетката на молекуларно ниво
- Зад комплексноста на живите организми се крие неверојатна едноставност:
 - Состав на биомолекулите (6 елементи): **C, H, O, N, P, S.**
 - Кај растенијата и животните се среќаваат **31 елемент.**
 - Сите организми имаат **слични биохемиски циклуси**
 - Сите организми имаат **ист генетски код**

БИОХЕМИЈА - ХЕМИЈА НА ЖИВИТЕ КЛЕТКИ

[illegible]

Био - макромолекули

Ограничен број биомолекули градат големи макромолекули



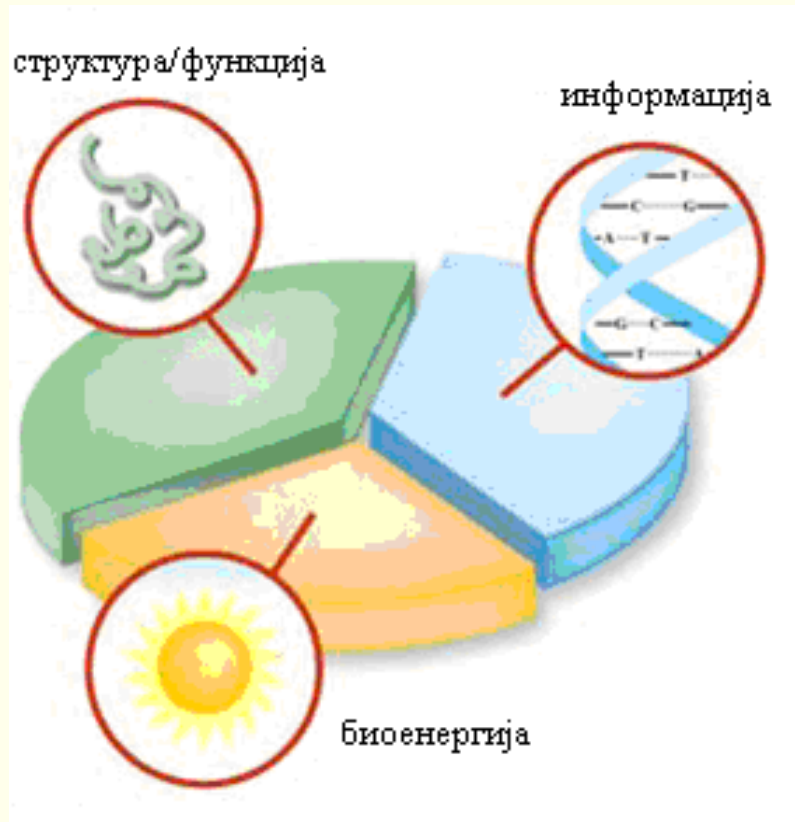
Биомакромолекулите:

- Самите се акумулираат (здружуваат) во клеточни структури и комплекси
- се препознаваат и стапуваат во интеракција едни со други на специфичен начин, со цел да се одвиваат клеточните функции (на пр., мембраните се комплекси од протеини и липиди)
- Интеракциите мешу нив се слаби и реверзибилни
- молекулите имаат три димензии и форма!
- За нив се карактеристични следниве функционални групи

Class of Compound	General Structure ^a	Functional Group Structure	Functional Group Name
Alkane	$\text{RCH}_2\text{—CH}_3$	$\begin{array}{cc} & \\ \text{—C—} & \text{—C—} \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array}$	Carbon–carbon and carbon–hydrogen single bonds
Alkene	RCH=CH_2	$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	Carbon–carbon double bond
Alcohol	ROH	—OH	Hydroxyl group
Thiol	RSH	—SH	Thiol or sulfhydryl group
Ether	R—O—R	—O—	Ether group
Amine ^{b)}	RNH_2 R_2NH R_3N	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{—N} \\ \diagdown \end{array}$	Amino group
Imine ^b	R=NH	$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}=\text{N—H} \\ \diagdown \end{array}$	Imino group
Aldehyde	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R—C—H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—C—H} \end{array}$	Carbonyl group
Ketone	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R—C—R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—C—} \end{array}$	Carbonyl group

Class of Compound	General Structure ^a	Functional Group Structure	Functional Group Name
Carboxylic acid ^b	$\text{R}-\text{COOH}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array}$	Carboxyl group
Ester	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{OR} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{OR} \end{array}$	Ester group
Amide	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\ \parallel \quad \diagup \\ -\text{C}-\text{N} \\ \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \text{H} \end{array}$	Amide group
Phosphoric acid ^b	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Phosphoric acid group
Phosphoric acid ester ^b	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Phosphoester group or phosphoryl group
Phosphoric acid anhydride ^b	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	Phosphoric anhydride group
Carboxylic acid-phosphoric acid mixed anhydride ^b	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ -\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{OH} \end{array}$	Acyl-phosphoryl anhydride

Биохемиско изучување



- **Структурна (функционална) биохемија:** хемиски структури, реактивност и 3D уредување на биомолекулите
- **Информациска биохемија:** пренесување на биолошките информации во клетките и организмите
- **Биоенергетска биохемија:** проток и трансформација на енергијата во организмите

ЦЕЛ НА КУРСОТ ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА БИОХЕМИЈА

Оспособување на студентот за:

- Прецизно користење на лабораторискиот инвентар
- Изведување различни пресметки и приготвување раствори
- Самостојно приготвување пуфер
- Екстракција на биомолекули од растенија, животни и бактерии
- Користење на компјутерски бази на податоци
- Статистичка анализа на резултатите
- Разбирање на општите концепти врз кои се базирани спектрофотометриските, хроматографски и електрофоретски методи.
- Препознавање на слабостите на одредени методи и предлагање на подобри или модификација на постојните.
- Следење на динамичките хемиски и биолошки промени

ОПШТИ ИНФОРМАЦИИ ЗА КУРСОТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА БИОХЕМИЈА (2+4)

Доц. д-р Наташа Ристовска

Предавања: вторник 10,00 часот; предавална 101

Лабораториски вежби: лабораторија 212

Две групи:

ПОТРЕБНИ ПОМАГАЛА:

- Интерна скрипта за предавања Наташа Ристовска, Експериментална Биохемија,
- Практикум по Експериментална биохемија
- Упатства за вежби
- Препорачани книги во електронска верзија
 - Rodney Boyer, Modern Experimental Biochemistry, 3rd Ed., Benjamin/Cummings, 2000
 - Garrett and Grisham, Biochemistry, 2nd Ed.
 - Lehninger, Nelson, Cox, Principles of Biochemistry, 5th Ed., Worth Publishers,

Наставна содржина

1. Вовед во биохемиска лабораторија
2. Општи лабораториски постапки
3. Пречистување и идентификација на биомолекулите со хроматографија
4. Спектроскопски анализи на биомолекулите
5. Центрифугирање
6. Радиоизотопите во биохемиското истражување
7. Карактеризација на протеините и нуклеинските киселини со електрофореза

Оценување

- 1 колоквиум или кумулативен писмен испит (удел 40%)
- Устен испит (удел 40%)
- Изработка на проектна задача (удел 8%)
- Квалитет на лабораториски извештаи (удел 7 %)
- Активност во наставата (удел 5%)

Пред почеток на вежбите

- Добро прочитајте го упатството за вежбата
- Со помош на блок дијаграм сумирајте ги основните чекори во експериментот
- Направете ги потребните пресметки за приготвување на растворите за анализа
- По проверката на овој дел отпочнуваат вежбите.

Во текот на вежбите

- Во лабораториска тетратка се запишуваат
 - Мерењата на рН, температура, маса на одвага и сл.
 - Набљудувањата (преципитација на раствори, промена на боја)
 - Пресметки со задолжителна употреба на единиците
 - Отстапувања од експерименталната постапка, намерни или случајни

По завршување на лабораториските вежби

Обработка на податоците

Решавање на зададени проблеми, молекулско моделирање

Пишување на лабораториски извештај

I. Вовед

II. Експеримент

- Табела на материјали и реагенси
- Список на опрема
- Шема, дијаграм на чекорите во постапката

III. Податоци и пресметки

- Претставување на конечните податоци во табели, графици или цртежи.

IV. Резултати и дискусија

- Заклучоци
- Споредба на резултатите со познати вредности
- Список на литературни референци

Приготвување и чување на раствори

- Квалитет на вода (дестилирана или дејонизирана вода)
- Подготовка на раствори
 - *Моларност (M)*
 - *Масен процент (% wt/wt);*
 - *Волуменски процент (%wt/vol);*
 - *Маса во волумен (wt/vol);*
- Услови за чување на реагенсите и растворите.

Масен удел

Пр. 1 Пригответе 2L 0,85% NaCl

- 1% раствор претставува 1 g на 100 mL, откаде произлегува дека

за 0,85% раствор се потребни 0,85 g NaCl на 100 mL.

- Бидејќи треба да се приготват 2 L што е 20 пати поголем волумен

од 100 mL, потребни се $20 \times 0,85$ g, односно 17g NaCl.

Односно со формули:

$$\omega = \frac{m(\text{NaCl})}{m(\text{rastvor})} = \frac{m(\text{NaCl})}{\rho \cdot V(\text{rastvor})} \qquad m(\text{NaCl}) = \omega \cdot \rho \cdot V(\text{rastvor})$$

Бидејќи густината на водниот раствор е 1 g/mL, тогаш

$$m(\text{NaCl}) = 0,0085 \cdot 1 \text{ g mL}^{-1} \cdot 2000 \text{ mL} \qquad m(\text{NaCl}) = 17 \text{ g}$$

Моларност

Пр. 2 Пригответе 200 mL 70 mM сахароза

$M(\text{сахароза}) = 342,3 \text{ g mol}^{-1}$

■ За приготвување 1M раствор потребни се 342,3 g сахароза а, за приготвување 70 mM, односно 0,07 M раствор треба да се одвагаат $0,07 \times 342,3 \text{ g} = 23,96 \text{ g}$.

■ Ова е масата потребна за приготвување 1L раствор, а за 200 mL, потребни се $0,2 \times 23,96 = 4,792 \text{ g}$, односно 4,8 g.

Или со формули:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{M \cdot V}$$

$$m(\text{сахароза}) = c \cdot M(\text{сахароза}) \cdot V$$

$$m(\text{сахароза}) = 0,07 \text{ mol L}^{-1} \cdot 342,3 \text{ g mol}^{-1} \cdot 0,2 \text{ L}$$

$$m(\text{сахароза}) = 4,792 \text{ g}$$

Приготвување на раствор

- Провери ја направената пресметка или спореди ја со некој од групата
- Употребувај дејонизирана вода
- Цврстата супстанца раствори ја во околу 80% од растворувачот
- Определи ја pH вредноста
- За дотерување на pH вредноста се додаваат киселина или база, при што постојано се меша на магнетна мешалка
- Дополни со растворувач до бараниот волумен во одмерна колба.

Разредување

Што е 10-кратно разредување?

- Кон 10 *mL* од растворот се додаваат 90 *mL* растворувач, до вкупен волумен 100 *mL*
- Кон 1 *mL* од растворот се додаваат 9 *mL* растворувач до вкупен волумен 10 *mL*

Што е 25-кратно разредување?

- Кон 4 *mL* од растворот се додаваат 96 *mL* растворувач, до вкупен волумен 100 *mL*
- Кон 1 *mL* од растворот се додаваат 24 *mL* растворувач до вкупен волумен 25 *mL*

Факторот на разредување × волумен од растворот кој го разредуваме = вкупен волумен на растворот што го приготвуваме

Односно со помош на формула

$$c_1 V_1 = c_2 V_2$$

Пр.3 Имате на располагање раствор од сахароза со концентрација 47 g/L. Треба да приготвите 100 mL раствор со концентрација 25 g/L.

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1}$$

$$V_1 = \frac{25 \text{ g L}^{-1} \cdot 100 \text{ mL}}{47 \text{ g L}^{-1}}$$

$$V_1 = 53 \text{ mL}$$

Квантитативен пренос на течности

