

Skrótowo treść zadania 10:

Sporządzić 200 ml roztworu wodnego (**mieszanina X**) zawierającego:

- 50 mM bufor Tris-HCl o pH 8,0
- 0,05% Triton X-100 (v/v)
- 50 nmoli dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (zredukowana forma – NADH)
- 20 µg/ml fluorku fenylometylosulfonylu (PMSF)
- 5 mM H₂SO₄

Masz pod ręką:

- Opakowanie Trisu firmy Roth (nr katalogowy 5429.3) – przygotuj sobie roztwór wyjściowy: 0,5 M bufor Tris-HCl o pH 8,0
- Roztwór 10% Tritonu X-100 (v/v)
- Opakowanie NADH firmy Sigma-Aldrich (nr kat. N1161) – korzystając z informacji producenta przygotuj sobie roztwór wyjściowy NADH, który będzie 1000x bardziej stężony niż w mieszaninie X
- Roztwór PMSF o stężeniu 20 mg/ml
- Butelka 96% kwasu siarkowego cz.d.a. firmy Roth (nr kat. 4623.3)
- Butelka kwasu solnego 37% cz.d.a. firmy Roth (nr kat. 4625.1)
- Woda dejonizowana

Rozwiązanie zadania 10

Przygotowanie roztworów wyjściowych:

1. **Tris-HCl pH 8,0:** w zlewce na 1 L zważyć 60,6 g Tris, rozpuścić w kilkuset (np. 800) ml H₂O, doprowadzić pH do 8,0 (pH-metr) za pomocą stężonego HCl (rada praktyczna: pod sam koniec dodawania kwasu dobrze jest wziąć mniej stężony, np. 3 lub 5 M, żeby nie „przedobrzyć”), przelać do cylindra na 1 L i dopełnić do 1 L. Można zrobić mniej tego buforu, w zależności od potrzeb – np. 200 ml, wtedy zważyjemy 5x mniej Trisu, czyli 5,05 g, rozpuścimy w mniejszej ilości wody, np. w ~100 ml, i doprowadzimy pH jak wyżej). Mamy w ten sposób **0,5 M Tris-HCl pH 8,0**

2. **NADH.** W informacji producenta podano:

M_{cz} NADH = 709,4 g/mol, zawartość NADH w produkcie = 98%, NADH rozpuszcza się w 0,01 M NaOH i jest stabilny w środowisku zasadowym (niestabilny w niższych pH), nie należy przygotowywać roztworów o stężeniu > 5 mM, 100 mg kosztuje 323 PLN.

Stężenie NADH w mieszaninie X ma wynosić 50 nmoli/0,2 L = 250 nM, a więc trzeba zrobić roztwór 250 µM (1000x bardziej stężony). Ile zrobić tego roztworu? Żeby wyjściowy roztwór NADH rozcieńczyć 1000x w 200 ml mieszaniny X, to musimy mieć przynajmniej 0,2 ml (200 ml : 1000x) 250 µM NADH. Ale z drugiej strony musimy wziąć pod uwagę jak małą ilość NADH jesteśmy w stanie zważyć w miarę dokładnie i niekłopotliwie i dobrze by było, żeby tego roztworu wystarczyło nam na całą serię doświadczeń (taka jest idea roztworów

wyjściowych – żeby nie ważyć przy każdym eksperymencie, tylko rozcieńczać – jest to szybsze i łatwiejsze).

Jeśli człowiek nie pamięta wzorów to posłużmy się logiką (zwróćcie uwagę na zamianę jednostek – g na μg , czyli mole zamieniają się na μmole i wtedy stężenie będzie μM , oczywiście jeśli objętość mamy 1 L). Tę zamianę robimy po to, aby mieć wszystko w takich samych jednostkach na poziomie mikro, można oczywiście operować cały czas molami, wtedy $250 \mu\text{M} = 250 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) :

Jeśli w 1 L rozpuścimy $709,4 \mu\text{g}$ NADH (czyli $1 \mu\text{mol}$) to uzyskamy $1 \mu\text{M}$ roztwór, zatem ile substancji musimy wziąć, aby uzyskać roztwór $250 \mu\text{M}$? Obliczymy to z proporcji:

$$\begin{array}{l} 709,4 \mu\text{g} - 1 \mu\text{M} \\ x - 250 \mu\text{M} \end{array}$$

$x = 250 \mu\text{M} \cdot 709,4 \mu\text{g} : 1 \mu\text{M} = 177350 \mu\text{g}$, czyli żeby zrobić $250 \mu\text{M}$ NADH musimy zważyć $177,35 \text{ mg}$ i rozpuścić w 1 L $0,01 \text{ M}$ NaOH.

Ale jest to dużo za dużo i nie jest to praktyczne ani ze względów finansowych ani z uwagi na trudność przechowywania (roztwory NADH przechowujemy w -20°C , najlepiej w małych porcjach zużywanych w kolejnych eksperymentach).

Praktyczne byłoby zrobienie 100x mniej tego roztworu, czyli 10 ml. Weźmy jeszcze pod uwagę, że NADH w NADH jest wg producenta 98%. Wobec tego:

$1,7735 \text{ mg} : 0,98 = 1,81 \text{ mg}$. A więc ważymy $1,8 \text{ mg}$ NADH i rozpuszczamy w 10 ml $0,01 \text{ M}$ NaOH – mamy **$250 \mu\text{M}$ NADH**.

Widać, że w praktyce można było pominąć tę informację producenta i założyć, że jest 100% NADH w NADH. Jeśli weźmiemy pod uwagę dokładność odmierzania roztworów pipetami i dopełniania mieszaniny do 200 ml w cylindrze – dokładność zważenia $\sim 1,8 \text{ mg}$ jest w zupełności wystarczająca i mieści się w granicach czułości wag analitycznych dostępnych w przeciętnym laboratorium biochemicznym.

3. **H_2SO_4** . $M_{\text{cz}} = 98$. Stężony kwas jest 96% i ma gęstość $d = 1,84 \text{ g/ml}$

Obliczamy liczbę gramów w 1 L roztworu (który waży 1840 g) z proporcji:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ g } 96\% \text{ (m/m) } \text{H}_2\text{SO}_4 - 96 \text{ g } \text{H}_2\text{SO}_4 \\ 1840 \text{ g } 96\% \text{ (m/m) } \text{H}_2\text{SO}_4 - x \end{array}$$

$$x = 1766 \text{ g } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ (w 1 L } 96\% \text{ roztworu tego kwasu)}$$

Ile moli kwasu będzie w 1 L (czyli jakie to stężenie molowe)? $1766 \text{ g/L} : 98 \text{ g/mol} = 18 \text{ mol/L} \rightarrow$ **18 M**

Czyli mamy już wszystkie roztwory wyjściowe, teraz wystarczy tylko odpowiednio je rozcieńczyć w mieszaninie X:

Dodawany roztwór wyjściowy	Stężenie roztworu wyjściowego (C_p)	Stężenie składnika w mieszaninie X (C_k)	Ile razy trzeba rozcieńczyć? ($C_p : C_k$)*	Jaką objętość roztworu wyjściowego dodać do mieszaniny X? (V_x : krotność rozcieńczenia)**
Tris-HCl pH 8,0	0,5 M	50 mM	10x	20 ml
Triton X-100	10%	0,05%	200x	1 ml
NADH	250 μ M	250 nM	1000x	0,2 ml
PMSF	20 mg/ml	20 μ g/ml	1000x	0,2 ml
H ₂ SO ₄	18 M	5 mM	3600x	0,0556 ml***

* Trzeba pamiętać aby jednostki były takie same, a więc np. w przypadku Tris-HCl: 500 mM : 50 mM = 10x. W przypadku NADH i PMSF od razu widać po jednostkach, że różnica między C_p i C_k jest 1000-krotna

**Objętość naszej mieszaniny $V_x = 200$ ml

***Lepiej byłoby sobie przygotować bardziej rozcieńczony roztwór H₂SO₄, np. taki, który trzeba będzie rozcieńczyć 200x (nie musimy wówczas otwierać za każdym razem butli ze stężonym kwasem pod wyciągiem, tylko możemy posłużyć się rozcieńczonym kwasem i pracować na naszym stole laboratoryjnym). Czyli nasz rozcieńczony kwas musiałby być 1 M (5 mM * 200x = 1000 mM). Zatem stężony kwas siarkowy musimy rozcieńczyć 18x. Najlepiej przygotować sobie objętość, która nam wystarczy na całą serię doświadczeń, niech to będzie 36 ml – łatwo policzyć 36 ml : 18x = 2 ml stężonego kwasu musimy dodać do 34 ml wody dejonizowanej (36 ml – 2 ml). Jeśli mamy roztwór wyjściowy H₂SO₄ o stężeniu 1 M, to będziemy dodawać **1 ml** (V_x * krotność rozcieńczenia \rightarrow 200 ml : 200x)

Dopełniamy wodą dejonizowaną do 200 ml. Praktyczna porada: lepiej najpierw do cylindra dodać pewną ilość wody, np. kilkadziesiąt ml, dodać składniki i uzupełnić do końcowej objętości. Czasami zmieszanie ze sobą stężonych substancji może spowodować wytrącenie się którejs z nich.

W biochemii bardzo rzadko używa się kolb miarowych, dokładność „cylindrowa” do robienia różnych buforów i mieszanin zwykle wystarcza.

To zadanie można było rozwiązać kilkoma sposobami:

1. Obliczając ilości substancji (moli, gramów), które trzeba dodać do mieszaniny X aby uzyskać zadane stężenie. Należy posłużyć się wzorem $c = n : V$, czyli $n = c * V$

Dla Tris-HCl: $n = 50 \text{ mmol/L} * 0,2 \text{ L} = 10 \text{ mmol}$

Czyli wiemy, że do mieszaniny X musimy dodać 10 mmoli Tris-HCl. Mamy 0,5 M Tris-HCl jako bufor wyjściowy. Obliczmy objętość przekształcając wzór: $V = n : C$, pamiętając, że jednostki muszą się zgadzać

$$V = 10 \text{ mmoli} : 0,5 \text{ M} = 10 \text{ mmoli} : 0,5 \text{ mmol/ml} = \mathbf{20 \text{ ml}}$$

Dla PMSF: $20 \mu\text{g/ml} * 200 \text{ ml} = 4000 \mu\text{g} = 4 \text{ mg}$ – tyle musimy dodać do mieszaniny X. Roztwór wyjściowy ma stężenie 20 mg/ml, a więc $V = 4 \text{ mg} : 20 \text{ mg/ml} = \mathbf{0,2 \text{ ml}}$

2. Korzystając ze wzoru $c_1 \cdot v_1 = c_2 \cdot v_2$

Dla Tris-HCl: $500 \text{ mM} \cdot x = 50 \text{ mM} \cdot 200 \text{ ml}$, $x = \mathbf{20 \text{ ml}}$

Dla PMSF: $20 \text{ mg/ml} \cdot x = 20 \text{ } \mu\text{g/ml} \cdot 200 \text{ ml}$. Pamiętajmy o jednostkach:
 $x = 20 \text{ } \mu\text{g/ml} \cdot 200 \text{ ml} : 20000 \text{ } \mu\text{g/ml}$, zatem $x = \mathbf{0,2 \text{ ml}}$

Dla Tritonu X-100: $10\% \cdot x = 0,05\% \cdot 200 \text{ ml}$, zatem $x = 0,05\% \cdot 200 \text{ ml} : 10\%$,
czyli $x = \mathbf{1 \text{ ml}}$

Jeśli chodzi o stężenia %, to pamiętajmy, że jest to ilość gramów substancji w 100 ml roztworu (m/v), albo ilość ml substancji w 100 ml roztworu (v/v), albo ilość gramów substancji w 100 g roztworu (m/m) i posłużmy się tą wiedzą.

Dla Tritonu X-100*: 0,05% stężenie(v/v) oznacza 0,05 ml 100% Tritonu w 100 ml roztworu, a więc 0,1 ml 100% Tritonu w 200 ml naszej mieszaniny X. My mamy 10% roztwór wyjściowy Tritonu, czyli 10x bardziej rozcieńczony, a więc musimy wziąć go 10x więcej niż 100% Tritonu. Zatem $0,1 \text{ ml} \cdot 10 = \mathbf{1 \text{ ml}}$.

*Triton X-100 jest niejonowym detergentem, 100% związek ma konsystencję gęstej cieczy (trochę jak kisiel), którą się trudno pipetuje. 10% roztwór zachowuje się praktycznie jak woda – łatwy od pipetowania, stąd zawsze lepiej zrobić sobie taki roztwór wyjściowy.