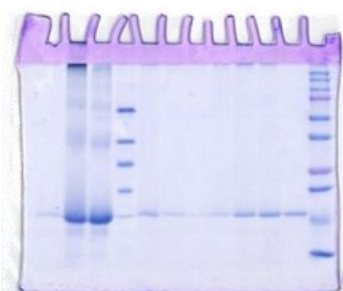
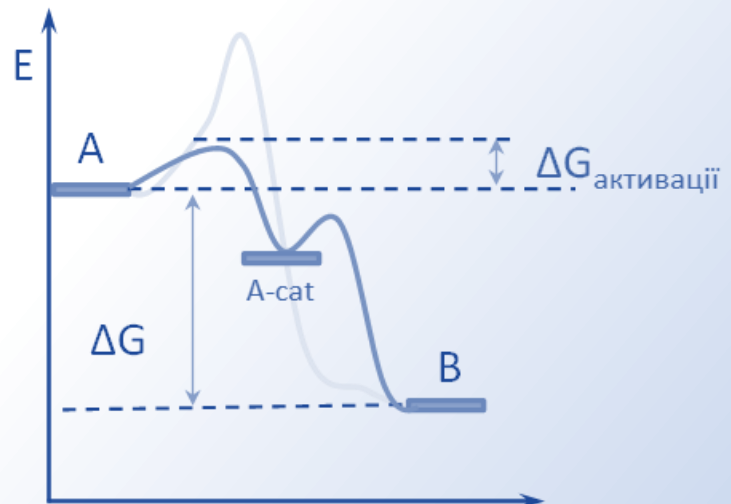
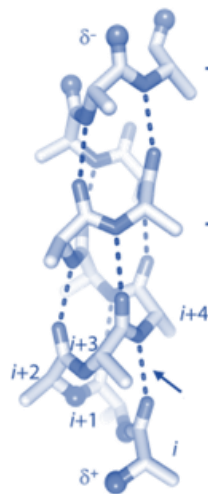
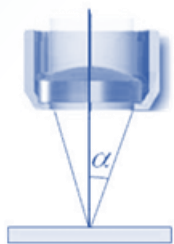
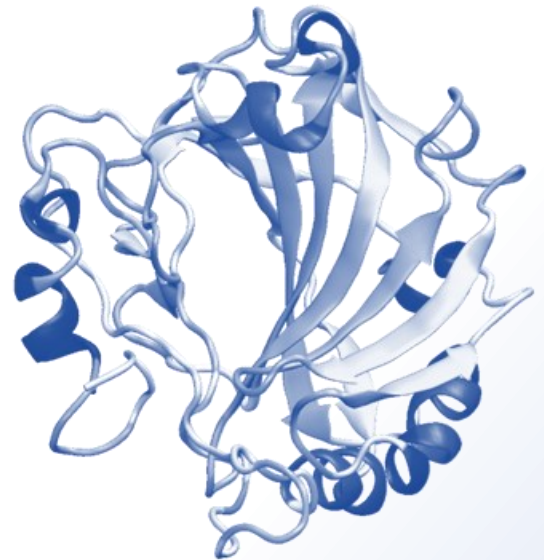
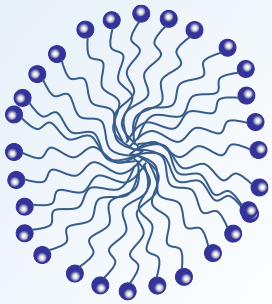




Володимир Швадчак

Біофізика та інструментальні методи в біології: збірник задач і вправ



Укладач: Швадчак В.В.

Біофізика та інструментальні методи в біології: збірник задач і вправ.
Івано-Франківськ, 2026. 143 с.

У навчальному посібнику «Біофізика та інструментальні методи в біології: збірник задач і вправ» розглянуто основні види розрахунків при кількісній оцінці взаємодій біологічних молекул, використанні абсорбційної, флуоресцентної та мас-спектроскопії для їх вивчення, а також основи структурної біології та мічення протеїнів. Завдання розбито на три рівні від найпростішого до рівня завдань реальної науково-дослідницької практики. Кожен розділ містить приклади розв'язків та короткі теоретичні відомості.

Навчальний посібник адресується студентам, аспірантам, науковим працівникам та викладачам в галузі біофізики інструментальних методів дослідження біологічних систем.

Рецензенти:

Пивоваренко Василь Георгійович, д-р хімічних наук, професор кафедри органічної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Галкін Максим Олексійович, д-р філософії в галузі біології, Дослідник Датського ракового інституту Датського ракового товариства

Посібник схвалено на засіданні кафедри біохімії та біотехнології Карпатського національного університету імені Василя Стефаника (протокол № 10 від 20 січня 2026 року)

Рекомендовано до друку Вченою радою факультету природничих наук Карпатського національного університету імені Василя Стефаника (протокол № 5 від 22 січня 2026 року)

Відповідальний редактор В.В. Швадчак

Зміст

Передмова.....	4
1. Молекули та розчини	6
1.1. Молекулярна маса. Кількість речовини.....	6
1.2. Розчини. Концентрація.....	8
1.3. рН та буферні розчини.....	16
2. Термодинаміка.....	22
2.1. Константи рівноваги.....	22
2.2. Функції стану та теорія термодинаміки.....	28
2.3. Окисно-відновний потенціал та рівняння Нернста.....	32
3. Кінетика	36
3.1. Кінетика простих процесів.....	36
3.2. Кінетика каталітичних процесів.....	44
3.3. Кінетика й інгібування.....	46
3.4. Моделювання процесів.....	47
4. Структура та властивості біологічних молекул.....	49
4.1. Зв'язки та взаємодії.....	49
4.2. Амінокислоти та пептиди.....	54
4.3. Просторова будова протеїнів.....	59
4.4. Структура ДНК і РНК.....	63
4.5. Візуалізація й аналіз структур біомолекул.....	69
5. Ліпіди й мембрани	72
5.1. Гідрофобність та гідрофільність.....	72
5.2. Фізичні властивості ліпідів та мембран. Модельні мембрани.....	74
5.3. Протеїн-мембранна взаємодія, мембранні протеїни.....	79
5.4. Транспорт крізь мембрану.....	80
5.5. Трансмембранний потенціал.....	81
6. Молекулярні машини. Рух. Ріст.....	83
6.1. АТФ-синтаза й біоенергетика.....	83
6.2. Джгутики бактерій.....	84
6.3. Моторні протеїни та цитоскелет.....	87
6.4. Ріст і поділ клітин.....	91
7. Фізичні методи в біології.....	93
7.1. Абсорбція.....	93
7.2. Флуоресценція.....	103
7.3. Флуорофори та хромофори.....	110
7.4. Мічення, біокон'югація, хімічна біологія.....	115
7.5. Круговий дихроїзм (CD) та інфрачервона спектроскопія (IR).....	118
7.6. Мас-спектроскопія (MS).....	120
7.7. Хроматографія.....	124
7.8. Гель-електрофорез.....	128
8. Додатки	130
8.1. Точність вимірювань та похибки.....	130
8.2. Приготування розчинів.....	133
8.3. Буферні розчини.....	140

Передмова

Про що ця книга? Багато людей сприймають біологію як описову науку, де ключову роль відіграють знання про живі організми. Проте, вона має й іншу сторону – розуміння фізичних та структурних закономірностей біологічних процесів та інструментальних методів для їх вивчення. Ці галузі біології прийнято називати біофізикою або біоаналітичною хімією. Саме про них і йтиме мова. Але розуміння чогось це не стільки знання, як вміння їх застосовувати для вирішення прикладних завдань. Саме тому книга є задачником, а не класичним підручником.

Для кого ця книга? Книга орієнтована на студентів та аспірантів, які вивчають предмети "біофізика" та "інструментальні методи в біології". Загальний рівень завдань достатньо високий, приблизно такий, який на мою думку потрібен для підготовки до наукової роботи в аспірантурі хороших світових університетів.

А чи не заскладна ця книга? Я намагався написати задачі, які не просто перевіряють вміння робити певні розрахунки, а вчать читачів певним ідеям, підходам чи фактам. В деяких задачах по інструментальних методах використано дані з реальних експериментальних досліджень, наводиться контекст, або заховані розповіді про помилки, які роблять дослідники. Тому задачі сильно різняться по складності, а деякі задачі вийшли нетипово довгими. Щоб трохи систематизувати задачі вони поділені на рівні

Обов'язковий рівень – задачі, які потрібно вміти розв'язувати всім, хто опановує дану тему. Вони приблизно відповідають рівню знань, який очікується від студентів-бакалаврів, що опановують даний предмет.

Середній рівень – задачі, що передбачають впевнене оперування матеріалом. Переважно вони вимагають застосування 2-3 логічних кроків в обчисленнях, комбінацію кількох формул, або розуміння нетривіальних залежностей. Це рівень відмінників та студентів, які планують поступати в аспірантуру або займатися науковою діяльністю.

Складніші завдання – можуть вимагати більшого часу на роздуми й розрахунки, передбачати певні припущення під час розв'язку, або розгорнуту неоднозначну відповідь. Вони писались для обдарованих студентів, слухачів вибіркового та спеціалізованих курсів та аспірантів.

Звісно, цей поділ на рівні складності умовний і сильно залежить від розділу книги та попереднього рівня знань читача. Розділ "Молекули і розчини" в цілому набагато легший за розділ "Фізичні методи в біології", який передбачає, що читач вже вільно оперує концентраціями.

Структура задачника. Книга складається з кількох глобальних частин:

- **Біофізична хімія:** розчини, термодинаміка, константи рівноваги, кінетика. Цей розділ, по суті містить вибрані розділи фізичної хімії, адаптовані до біологічного контексту.
- **Структурна біологія:** структура протеїнів, ДНК/РНК, мембрани, типи зв'язків – дещо ширше ніж зазвичай подається в підручниках, тут більше хімічних та фізичних деталей, але також окремо включено розділ по візуалізації й аналізу тривимірних структур. Також до цієї частини віднесено транспорт крізь мембрану та трансмембранний потенціал.
- **Біофізика руху:** моторні протеїни, цитоскелет, бактеріальний джгутик, АТФ-синтаза – в ключі енергій, сил та особливостей збирання й структури.
- **Інструментальні методи:** найбільше уваги приділено абсорбції, флуоресценції та введенню міток. Проте розглянуто кілька цікавих практичних аспектів хроматографії та мас-спектроскопія протеїнів.

Чого немає в підручнику. Статистики – це доволі об'ємна тема і по ній є багато корисних підручників (особливо англійською). Мікроскопії – флуоресцентна та світлова мікроскопія є одними з ключових методів сучасних біологічних досліджень, проте справді якісні задачі з них, на мою думку мають передбачати роботу з оригінальними файлами, які неможливо розмістити в друкованому підручнику.

Про ШІ для розв'язку задач. Станом на 2025 рік більшість задач обов'язкового рівня та близько половини завдань середнього рівня може бути коректно розв'язана неспеціалізованими системами ШІ типу ChatGPT. Тобто ви можете застосовувати ШІ для перевірки коректності ваших розв'язків або для отримання підказок. Проте, такий розвиток можливостей ШІ має і ще один наслідок – в найближчому майбутньому варто очікувати, що дослідник матиме змогу застосовувати ШІ для розв'язку рутинних завдань і буде потреба в людях, які зможуть аналізувати доволі складні завдання й розбивати їх на простіші. Саме на це частково й орієнтовані складніші завдання в цій книзі.

Біофізична хімія

1. Молекули та розчини

Кількість речовини. Молекулярна маса. Способи вираження концентрацій. Розрахунки концентрацій розчинів. рН. Буферні розчини.

1.1. Молекулярна маса. Кількість речовини.

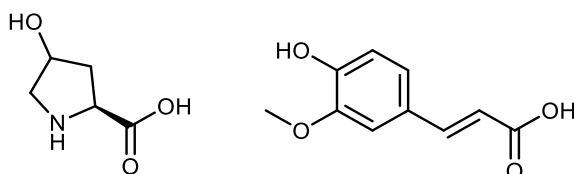
Пам'ятка:

- 1 моль = $6,022 \cdot 10^{23}$ молекул. (N_A)
- Молекулярна маса речовини (MW) вимірюється в г/моль.
- Відносна молекулярна маса (Mr) – безрозмірна величина.
- В біології для позначення маси часто використовують дальтони (Да) та кілодальтони (кДа).
1 кДа = 1000 Да = 1000 г/моль.

Обов'язковий рівень

1. Розрахуйте молекулярну масу сульфату магнію, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, ацетилсаліцилової кислоти.

2. Розрахуйте молекулярну масу цих двох речовин.



3. Наскільки сильно відрізняється молекулярна маса натрієвої солі бензойної кислоти від маси самої кислоти (в %)?

4. Скільки молекул міститься в 1 нг протеїну молекулярною масою 25 kDa?

5. Яка молекулярна маса молекули вірусної РНК довжиною 20 тисяч основ?

6. Молекулярна маса протеїну довжиною 220 амінокислот становить близько 25 кДа. Оцініть, яка середня молекулярна маса однієї амінокислоти та скільки приблизно амінокислот міститься в протеїні з MW= 15,6 кДа.

7. Скільки грам KCl потрібно розчинити у воді, щоб утворена концентрація хлорид іонів була така ж як і при розчиненні 1 г NaCl?

8. Скільки приблизно моль міститься в 1 мкг протеїну молекулярною масою 25 kDa?

Середній рівень

Приклад 1:

Скільки молекул барвника міститься в 1 мкл 1 нМ розчину?

Розв'язок:

$$V = 1 \text{ мкл} = 10^{-6} \text{ л}$$

$$C = 1 \text{ нМ} = 10^{-9} \text{ моль/л}$$

$$\text{Кількість речовини} = C \cdot V = 10^{-15} \text{ моль}$$

$$N = N_A \cdot n = 6,022 \cdot 10^{23} (\text{молекул/моль}) \cdot 10^{-15} \text{ моль} = 6,022 \cdot 10^8 \text{ молекул}$$

9. Яйцеклітина вигаданої тварини має форму сфери діаметром 100 мкм і містить 300 молекул пептиду NADVIRNA. Яка середня концентрація цього пептиду в клітині (в нМ)?

10. Клітини певної лінії мають об'єм близько $2 \cdot 10^{-12}$ л. Якщо в таку клітину потрапить рівно одна молекула інгібітора, то яка буде його концентрація?

11. В дослідженнях на мишах вам потрібно використовувати доволі багато високочистого α -кетоглутарату. Ви працюєте в буферному розчині, де і α -кетоглутарова кислота і її натрієва сіль дають один і той самий розчин з частково депротонованою формою. Що вигідніше купувати: чисту кислоту ($C_5H_6O_5$) в упаковках по 25 г ціною 38 Євро чи кристалогідрат її динатрієвої солі ($C_5H_4O_5Na_2 \cdot 2H_2O$) по ціні 129 Євро за 100 г упаковку. (Ціни реальні)

12. Для експериментів FCS зручно мати розчин в якому концентрація флуорофору відповідає приблизно 1 молекулі на 1 мкм^3 . Скільки це в нМ?

13. Протеїн X з молекулярною масою 23 кДа містить 1 цистеїн. Скільки потрібно взяти чистої амінокислоти цистеїну (в мг), щоб вона містила таку саму кількість молекул, як в 1 г протеїну X?

Складніші завдання

14. Для рентгеноструктурного аналізу протеїнів використали кристал розміром близько $0,1 \times 0,1 \times 0,1$ мм. Скільки приблизно молекул 36 кДа протеїну міститься в такому кристалі?

15. Клітина *Escherichia coli* має довжину приблизно 2 мкм і діаметр біля 800 нм та містить близько 15 000 копій рибосоми. Оцініть їх концентрацію в клітині (в нМ).

1.2. Розчини. Концентрація.

Пам'ятка:

- При розведеннях розчинів $C_1V_1 = C_2V_2$
- При змішуванні розчинів однієї й тієї ж речовини $C_f = (C_1V_1 + C_2V_2) / (V_1 + V_2)$
- Концентрація в г/л (W) переводиться в молярну концентрацію (в моль/л) шляхом ділення на молярну масу (в г/моль) $C = W / MW$. Наприклад: 1 г/л NaCl це те ж що і (1 г/л) / (58,5 г/моль) = 0,179 моль/л.
- Термін “1% розчин” слід розуміти як “розчин з концентрацією 10 г/л” (тобто робиться припущення що для всіх розчинів 1 л = 1000 г, що достатньо коректно для розведених розчинів).
- Записи 1 мкМ, $1 \cdot 10^{-6}$ М, 10^{-6} М, 0,000001 моль/л, 1 μ М, 0.000001 mol/L є рівнозначними, 1 мМ, 1 mM, 0.001 mol/L, 0,001 моль/л – теж. Формат запису μ М, mol/L, mM використовується в англомовних джерелах і не відповідає українським стандартам.
- В межах цього задачника, якщо не вказана густина розчину, то її можна вважати рівною 1 г/мл для водних розчинів, або густині розчинника для неводних розчинів.
- $m = \rho V$ (маса розчину рівна добутку густини на об'єм).
- Для багатьох розчинів неорганічних солей густина змінюється приблизно на 0,05-0,1 г/мл для кожних 10% концентрації розчину. Скажімо 10% розчин КОН має густину близько 1,1 г/мл, а 10% розчин HCl – близько 1,05 г/мл.

Обов'язковий рівень

Приклад 1:

10 мг протеїну з молекулярною масою 20 кДа розчинили в 1.5 мл буферу. Яка молярна концентрація утвореного розчину?

Розв'язок:

$$W = m / V = 10 \text{ мг} / 1,5 \text{ мл} = 0,01 \text{ г} / 0,0015 \text{ л} \approx 6,667 \text{ г/л.}$$

$$C = W / MW = (6,667 \text{ г/л}) / (20000 \text{ г/моль}) = 3,333 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л} = 333,3 \text{ мкМ.}$$

Англомовна нотація: $W = m / V = 10 \text{ mg} / 1.5 \text{ mL} = 0.01 \text{ g} / 0.0015 \text{ L} \approx 6.667 \text{ g/L.}$

$$C = W / MW = (6.667 \text{ g/L}) / (20000 \text{ g/mol}) = 3.333 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} = 333.3 \text{ }\mu\text{M}$$

Приклад 2:

4 мкл 88 мкМ розчину родаміну в воді додали до 20 мкл води.

Яка концентрація барвника в утвореному розчині (мкМ)?

Розв'язок:

$$C_1 = 88 \text{ мкМ}, V_1 = 4 \text{ мкл}$$

$$C_2 = x, V_2 = 4 + 20 = 24 \text{ мкл}$$

$$C_2 \cdot V_2 = C_1 \cdot V_1; \quad C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = 88 \cdot 4 / 24 \approx 14.67 \text{ мкМ}$$

16. Скільки грам сульфату натрію потрібно щоб приготувати 100 мл 1% розчину?
17. Розрахуйте скільки грам хлориду натрію потрібно для приготування 50 мл 3 М розчину.
18. Яка концентрація хлорид іонів в 10 мМ розчині CaCl_2 ?
19. Скільки мілілітрів оцтової кислоти ($\rho = 1,05 \text{ г/мл}$) потрібно взяти, щоб приготувати 500 мл 1 мМ розчину?
20. Яка концентрація іонів калію (в мМ) в розчині K_2SO_4 з концентрацією 2 г/л?
21. Розрахуйте концентрацію (в моль/л) 1% HCl .
22. В медицині часто застосовують фізіологічний розчин – стерильний водний розчин, який містить 0,9% хлориду натрію. Яка його концентрація в мМ?
23. Який розчин HCl більш концентрований: 100 мМ чи 0.15%?
24. Де міститься більше спирту: в 50 мл горілки (40°) чи в пів літрі пива (3,5°)?
25. Скільки грам $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ потрібно взяти для приготування 1 л 10 мМ фосфатного буферу з $\text{pH} = 7,4$?
26. Скільки грам NaCl міститься в 1 л розчину з "фізіологічною іонною силою", що містить 150 мМ NaCl ?
27. 1 мг протеїну розчинили в 1 мл буферу й отримали 0,1 мМ розчин. Яка молекулярна маса протеїну?
28. 3 мг барвника молекулярною масою 474 г/моль розчинили в 0,2 мл DMSO . Яка концентрація утвореного розчину?
29. В якому з розчинів міститься більше розчиненої речовини (в г/л): 3 М розчині NH_4Cl чи 1 М розчині $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$?
30. Скільки 7 мМ буферу можна приготувати з 1 кг TRIS ($\text{MW} = 121,14 \text{ г/моль}$)?
31. Скільки грам лимонної кислоти ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) потрібно засипати в 250 мл мірну колбу й довести до мітки водою щоб приготувати 0,1 М розчин ?

32. 2 мкл 78 мкМ розчину флуоресцеїну в етанолі додали до 100 мкл води. Яка концентрація (моль/л) **етанолу** в утвореному розчині?
33. 1 л води змішали з 1 л спирту та отримали 1,97 л суміші. Поясніть куди поділось 30 мл об'єму й що сталося на молекулярному рівні.
34. У чому різниця між насиченими та перенасиченими розчинами?
35. Скільки мілілітрів 10% розчину цукру потрібно для приготування 1 л 1 мМ розчину?
36. 1 мг/мл розчин лимонної кислоти містить більше ніж 1 мМ карбоксильних груп чи менше?
37. Мінеральна вода з одного з джерел у Трускавці містить 120 мг/л гідрокарбонатів. Скільки це в молях/л?
38. Максимальний допустимий вміст іонів міді питній у воді 1000 мкг/л. Якій молярній концентрації це відповідає?
39. Розчинність KCl становить 38 г/100 г води (при 20°C). Скільки мілілітрів води потрібно щоб розчинити 50 г KCl?
40. Яка масова частка цукру у розчині, отриманому додаванням 10 г цукру до 30 г води?
41. У вас є 100 мл 10% розчину глюкози. Який об'єм 1 М розчину можна з нього приготувати?

Середній рівень

Приклад 3:

У вас є 100 мкл 30 мкМ розчину протеїну PR1 та 200 мкл 20 мкМ розчину протеїну PR2.

Як приготувати 200 мкл розчину, що містить 20 мкМ PR1 та 10 мкМ PR2.

Розв'язок:

Для приготування не обов'язково використати весь об'єм наявних розчинів, але потрібно перевірити чи їх буде достатньо. Вважаємо, що потрібно змішати певні об'єми розчинів PR1, PR2, води.

Спочатку рахуємо скільки потрібно взяти розчину PR1:

$$V_2 = C_1 \cdot V_1 / C_2 = 200 \cdot 20 / 30 \approx 133,3 \text{ мкл.}$$

Так само розрахуємо скільки потрібно взяти розчину PR2:

$$V_3 = C_1 \cdot V_1 / C_3 = 200 \cdot 10 / 20 \approx 100 \text{ мкл.}$$

Відповідно все решта – вода. Проте, $V_2 + V_3 = 133,3 + 100 = 233,3$ мкл, що більше за потрібний об'єм розчину, 200 мкл. Відповідно, з заданих розчинів приготувати потрібний розчин неможливо.

42. 10 мкл 188 мкМ розчину родаміну в воді додали до 200 мкл 20 мМ розчину HCl. Яка концентрація барвника в утвореному розчині (мкМ)?
43. 4 мг флуоресцентно міченого пептиду з молекулярною масою 4444 г/моль розчинили в 0,5 мл 10 мМ фосфатного буферу (pH=7,4), що містить 150 мМ NaCl. Яка концентрація пептиду в утвореному розчині?
44. Скільки мікролітрів 120 мкМ розчину протеїну EGFP-PR1 потрібно, щоб приготувати 500 мкл 20 мкМ розчину?
45. 1 столову ложку цукру розчинили у стакані води. Оцініть концентрацію утвореного розчину в г/л та в моль/л.
46. З якими проблемами ви стикнетесь коли спробуєте приготувати 15 М розчин лимонної кислоти (C₆H₈O₇) та її 15 нМ розчин з твердої речовини та води?
47. Людина випила 500 мг таблетку парацетамолу. Припустіть, що препарат рівномірно розподілився по тілу в незмінній формі. Яка приблизно молярна концентрація парацетамолу досяглась в клітинах?
48. Якщо 4 мкл 80 мкМ розчину пептиду додати до 20 мкл буферного розчину, то якою буде концентрація пептиду в утвореному розчині?
49. Скільки мілілітрів концентрованої H₂SO₄ (96%) потрібно для приготування 1 л 1 мМ розчину (густина взяти з довідників).
50. Розчинність нітрату натрію у 100 мл води становить 88 г при 20°C та 110 г при 50°C. Студент зважив 100 г NaNO₃, додав до нього 100 мл води та повністю розчинив при нагріванні. Що станеться при охолодженні розчину до 20°C?
51. У вас є 153 мкМ розчин протеїну X. Як приготувати 100 мкМ розчин об'ємом 200 мкл?
52. У вас є 120 мкл 166 мкМ розчин протеїну Y молекулярною масою 18,8 kDa. Як приготувати 1 мл його 1 мкМ розчину?
53. Студент додав 4 мкл 77 мкМ розчину альбуміну в кювету, де було 1200 мкл буферу. Яка концентрація протеїну в утвореному розчині?
54. Змішали 20 мл 100 мМ розчину хлориду натрію та 80 мл 10 мМ TRIS буферу (pH=8,5). Яка концентрація TRIS та NaCl в утвореному розчині?
55. Який мінімальний вміст солей (у г/л) може бути у нейтральному розчині, що містить 0,5 М хлорид іонів?
56. У вас є 3 М розчин NaCl, 100 мМ фосфатний буфер (pH = 7,4), розчин глюкози концентрацією 2 мг/мл. Як приготувати 10 мМ фосфатний буфер, що містить 150 мМ NaCl та 1 мМ глюкозу?

- 57.** Для візуалізації ядер клітин під час флуоресцентної мікроскопії використовують барвник DAPI, який додають до середовища в концентрації 30 нМ. Ви працюєте з 8-лунковими слайдами (так звані "Lab-Tek"), де в кожен лунку вноситься близько 200 мкл середовища. Наразі у вас в лабораторії залишилась тільки одна мікропробірка ("епендорф") барвника – приблизно 50 мкл 5 мкМ розчину. На скільки зразків (лунок) вам її вистачить?
- 58.** Ви маєте 100 мкМ розчин протеїну X молекулярною масою 42 кДа. Скільки його потрібно помістити в лунку для гель-електрофорезу, щоб отримати в ній 20 мкг протеїну?
- 59.** В якому з розчинів концентрація іонів хлору вища: 10 мМ NaCl чи 0,1% CaCl₂?
- 60.** До 100 мл 1% розчину NaOH додали 10 мл його 8% розчину. Яка фінальна концентрація утвореного розчину в % та в моль/л?
- 61.** Чи можна з 150 мкМ розчину протеїну у чистій воді, 20 мМ буферу та дистильованій воді приготувати 100 мкМ розчин цього протеїну в 10 мМ буфері і якщо можна то як?
- 62.** Чи можна з 200 мкМ розчину протеїну у 10 мМ буфері, 20 мМ буферу та дистильованій воді приготувати 100 мкМ розчин цього протеїну в 10 мМ буфері і якщо можна то як?
- 63.** До кювети, що містила 800 мкл 1 мкМ розчину протеїну, додали 50 мкл 1 мМ розчину ДНК. Яка концентрація ДНК та протеїну в утвореному розчині?
- 64.** У вас є 10% розчин глюкози й вода. Як приготувати 100 мл 1 мМ розчину глюкози?
- 65.** До 900 мл 1 М розчину HCl додали 100 мл води. Обчислити молярну концентрацію одержаного розчину.
- 66.** 4,3 мг барвника з молекулярною масою 474 г/моль розчинили в 0,5 мл ДМСО. Яка концентрація утвореного розчину в мкМ?
- 67.** 4 мкл 88 мкМ розчину родаміну в воді додали до 1 мл води. Яка концентрація барвника в утвореному розчині (нМ)?
- 68.** В кювету з 1 мл буферного розчину додали 10 мкл 2 мМ розчину родаміну в ДМСО. Яка молярна концентрація родаміну та ДМСО в утвореному розчині?
- 69.** В кювету з 1 мл толуену додали 10 мкл 1 мМ розчину флуоресцеїну в ДМСО. Яке молярне співвідношення води та ДМСО в кюветі (скільки молекул води припадає на 1 молекулу ДМСО)?
- 70.** До 400 мкл 100 мкМ розчину мелітину додали 100 мкл 1 мМ розчину ліпосом POPC. Яка концентрація мелітину та POPC в утвореному розчині (мкМ)?

71. Студент випадково перекинув стакан з 100 мл 37% хлоридної кислоти ("концентрована солянка"). Скільки приблизно грам соди (Na_2CO_3) потрібно щоб нейтралізувати кислоту перш, ніж витирати підлогу?

Приклад 4:

Скільки 1 мМ розчину ліпосом POPC потрібно додати до 500 мкл 100 нМ розчину мелітину, щоб співвідношення ліпід:мелітин становило 200:1?

Розв'язок (через молі):

Розраховуємо кількість моль мелітину у розчині

$$500 \text{ мкл} = 500 \cdot 10^{-6} \text{ л}$$

$$100 \text{ нМ} = 100 \cdot 10^{-9} \text{ моль/л}$$

$$\text{Моль(мелітин)} = 500 \cdot 10^{-6} \text{ л} \cdot 100 \cdot 10^{-9} \text{ моль/л} = 50000 \cdot 10^{-15} \text{ моль} = 50 \cdot 10^{-12} \text{ моль}$$

множимо на співвідношення, щоб отримати кількість моль ліпідів.

$$\text{Моль(ліпідів)} = \text{Моль(мелітин)} \cdot \text{співвідношення} = 50 \cdot 10^{-12} \text{ моль} \cdot 200 = 10\,000 \cdot 10^{-12} \text{ моль} = 10^{-8} \text{ моль}$$

З кількості речовини й концентрації ліпідів розраховуємо об'єм розчину.

$$V(\text{lip}) = \text{Моль(ліпідів)} / C(\text{ліпідів}) = 10^{-8} \text{ моль} / (0,001 \text{ моль/л}) = 10^{-5} \text{ л} = 10 \text{ мкл}$$

Розв'язок (короткий):

$$C_1 \cdot V_1 / R_1 = C_2 \cdot V_2 / R_2 \text{ де } R_1 \text{ і } R_2 \text{ – коефіцієнти співвідношення}$$

Ліпосоми

$$C_1 = 1 \text{ мМ} = 1000 \text{ мкМ}$$

$$V_1 = x \text{ (треба знайти)}$$

$$R_1 = 200 \text{ (бо 200 ліпідів на 1 мелітин)}$$

Мелітин

$$C_2 = 100 \text{ нМ} = 0,1 \text{ мкМ}$$

$$V_2 = 500 \text{ мкл}$$

$$R_2 = 1 \text{ (бо 1 мелітин на 200 ліпідів)}$$

$$1000 \text{ мкМ} \cdot x / 200 = 0,1 \text{ мкМ} \cdot 500 \text{ мкл} / 1$$

$$x = 0,1 \text{ мкМ} \cdot 500 \text{ мкл} / 1000 \text{ мкМ} \cdot (200/1) = 10 \text{ мкл}$$

72. У вас є 0,5 мл 100 мкМ розчину протеїну. Скільки до нього потрібно додати 1 мМ розчину мітки, щоб вона була в 2-х кратному надлишку?

73. В кюветі є 400 мкл розчину протеїну BSA концентрацією 1 мкМ. До неї додають 7 мкМ розчин барвника ThT до співвідношення 1:1. Скільки потрібно додати? Яка буде концентрація ThT та BSA в утвореному розчині?

- 74.** В кюветі є 400 мкл розчину протеїну BSA концентрацією 5 мкМ. До неї додають 50 мкл 1 мМ розчину двониткової ДНК (концентрація основ). Скільки пар основ припадає в розчині на 1 молекулу протеїну?
- 75.** Аспірант хотів приготувати 100 нМ розчин барвника у 1 мл буферу. Він взяв
- 76.** Яку максимальну концентрацію (в моль/л) етанолу можна створити у воді?
- 77.** В англомовній літературі для опису дуже низьких концентрацій речовин, скажімо забрудників в середовищі часто застосовують мільйонні частки, ppm (parts per million), які показують скільки грам розчиненої речовини припадає на 1 мільйон грамів розчину. Яка концентрація в мМ відповідає 10 ppm іонів кадмію у воді?
- 78.** При розчиненні кристалогідрату дигідрофосфату натрію доволі швидко розчинилися дрібні кристали й залишився прозорий розчин, на дні якого лежать великі кристали. Чи можна вважати, що розчин дійшов точки насичення? Як це можна перевірити?
- 79.** В кювету налили 450 мкл розчину протеїну А з концентрацією 1 мкМ та почали потроху додавати 1 мМ розчин ліпідів (ліпосом). Яка буде концентрація протеїну та ліпідів у кюветі коли буде досягнуто співвідношення 100 ліпідів на 1 протеїн?
- 80.** Ви вивчаєте вплив важких металів на ріст рослин. Для контрольованого експерименту вам потрібно приготувати середовище що містить 20 мг/л срібла. Скільки грам нітрату срібла вам потрібно взяти на 1 л такого середовища?

Складніші завдання

- 81.** Студент готує експеримент на мікропланшетах де в кожен лунку вносять по 50 мкл розчину. Йому потрібно протестувати активність інгібітора в концентраціях 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 нМ в присутності 5 нМ ферменту та 1 мМ субстрату. В лабораторії є 10 мМ розчин субстрату і 1 мкМ розчини ферменту та інгібітора. Розрахуйте який об'єм кожного з розчинів потрібно для експерименту.
- 82.** Ви плануєте експеримент в якому будете вивчати кінетику ферментативної реакції – розрізання пептиду (100 мкМ) протеазою (1 мкМ) в буфері, що містить 140 мМ NaCl та 10 мМ фосфату (pH=7). У вас є 890 мкМ розчин пептиду в дистильованій воді, 28 мкМ розчин протеази в буфері, що не містить солі, 2x буфер (тобто вдвічі концентрованіший, ніж потрібно – 280 мМ NaCl та 20 мМ фосфату), дистильована вода. Як приготувати потрібний розчин об'ємом 500 мкл?
- 83.** Науковій групі вдалося синтезувати 2,5 мг пептиду, який має хорошу антизапальну активність *in vitro* й відносно невисоку молекулярну масу

(MW= 1756). Вчені хочуть протестувати його на мишах і планують вводити по 30 мкл 100 мкМ розчину в тварину щодня протягом 3 тижнів. Чи вистачить цієї кількості пептиду, щоб провести експеримент на групі з 10 тварин?

84. Ви отримали для тестування біологічної активності хімічну речовину з молекулярною масою 374 г/моль, відважили 2 мг та розчинили в 200 мкл ДМСО (тому що вона не настільки добре розчинялась у воді). Тепер вам потрібно додати 10, 100, 1000 нМ цієї речовини в тестові розчини об'ємом 500 мкл. Як це зробити, якщо мінімальний об'єм, який ви можете з достатньою додати становить 2 мкл? З окремого тесту вам відомо, що речовина розчиняється у воді у концентраціях 100 мкМ і нижче.

85. Щоб визначити активність інгібітора в широкому діапазоні концентрацій при первинному тестуванні зручно готувати розчини методом послідовних розведень (serial dilutions). Аспірант приготував 8 півтораamilітрових мікропробірок ("епендорфів") для тестових зразків та одну "технічну". Спершу він налив у технічну пробірку 400 мкл 100 мкМ розчину інгібітора. Потім – відібрав з неї 200 мкл та додав у пробірку №1. Потім – додав у технічну пробірку 200 мкл буфера, добре перемішав та відібрав 200 мкл утвореного розчину у пробірку №2, знову додав у технічну пробірку 200 мкл буфера, перемішав, відібрав у зразок №3 і так далі, до зразка №6 включно. У зразки №7 та 8 додав просто по 200 мкл буферу. (Ці зразки використовувались як контроль без відсутності інгібітора і порівнювались з усіма іншими зразками тому їх доречно було поміряти два незалежних рази). Після цього в кожен зі зразків 1-8 він додав по 80 мкл 5 мМ субстрату, 20 мкл 20 мкМ ензиму та 200 мкл буферу, отримавши всюди сумарний об'єм 500 мкл. Розрахуйте концентрацію інгібітора у кожному зі зразків.

1.3. рН та буферні розчини

Пам'ятка:

- $pH = -\text{Lg} [H^+]$; $pOH = -\text{Lg} [OH^-]$
- $[H^+][OH^-] = 10^{-14}$ (справедливо для розведених водних розчинів при кімнатній температурі). $pH = 14 - pOH$
- Сильні кислоти, луги, та їх солі в воді дисоціюють практично повністю
- Для дуже розведених розчинів (<1 мкМ) варто враховувати також дисоціацію води
- $pK_a = -\text{Lg} K = -\text{Lg} \left(\frac{[H^+][An^-]}{[HAn]} \right)$ міра сили кислоти, чим вона нижча, тим повніше дисоціює кислота. Наприклад, для оцтової кислоти $pK_a=4.76$, що означає що

$$10^{-4.76} = 1.73 \cdot 10^{-5} = \frac{[H^+][CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]}$$
- рН розчинів слабких кислот можна розрахувати як

$$K_a = \frac{[H^+][An^-]}{[HAn]}$$
 припускаємо $[H^+] = x$. Тоді $[An^-] = x$, а $[HAn] = C - x$
- $K_a = \frac{x^2}{C - x}$; $CK_a - xK_a = x^2$; $x^2 + xK_a - CK_a = 0$; $x = \frac{-K_a + \sqrt{(K_a)^2 + 4CK_a}}{2}$
- $pH = -\text{Lg} \frac{-K_a + \sqrt{(K_a)^2 + 4CK_a}}{2}$
- Приблизна формула для слабких кислот ($K_a \ll C$): $pH = \frac{pK_a - \text{Lg} C}{2}$
- Приблизна формула для рН буферів: $pH = pK_a + \text{Lg} \frac{[An^-]}{[HAn]}$
- При підвищенні температури вода дисоціює більше і $pH + pOH < 14$.

Обов'язковий рівень

- 87.** Які з наведених речовин практично повністю дисоціюють у воді та на які іони: NaF, KCl, CH₃COONa, CH₃OH, CF₃COOH, MgSO₄? Кислим, лужним чи нейтральним буде розчин кожної з цих речовин?
- 88.** Розмістіть наведені кислоти від найслабшої до найсильнішої: PhCOOH, H₂S, H₂SO₄, CH₃COOH, CCl₃COOH.

89. Які з наведених нижче сполук будуть краще розчинятися у лужному середовищі, які – в кислотному, а які мало змінювати розчинність залежно від рН?

90. Лужним (рН > 8), кислим (рН < 6), чи практично нейтральним (6 < рН < 8) буде 1 мМ розчин таких сполук: гідрофосфат натрію, хлорид амонію, сульфат магнію, ацетат калію, карбонат натрію?

Приклад 1:

Розрахуйте рН 1 мМ розчину NaOH.

Розв'язок: $[\text{OH}^-] \approx C_{\text{NaOH}} = 0,001\text{M}$; $\text{pOH} = -\lg 0,001 = 3$; $\text{pH} = 14 - \text{pOH} = 11$

91. Яка концентрація іонів H^+ та OH^- у 1 мкМ розчині протеїну з рН = 7?

92. Яка концентрація іонів H^+ та OH^- у розчині з рН = 3,5?

93. 1 мкМ розчин NaCl з рН = 7 розвели водою вдвічі. Як при цьому зміниться рН та концентрація H^+ у розчині?

94. Який рН 1,2 мМ розчину HCl?

95. Який рН 11 мМ розчину NaOH?

96. Який рН 9 мМ розчину NaCl?

97. 10 мл розчину HNO_3 з рН = 2 розвели до 1 л. Яким буде рН утвореного розчину?

98. До 1 л води додали 1 мг сухого NaOH. Яким буде рН утвореного розчину?

99. рН слини становить $6,6 \pm 0,1$. Яка в ній концентрація протонів? ($x \pm dx$ мкМ)

100. Для гістидину $\text{pK}_{\text{A}1} = 1,7$ (карбоксильна група), $\text{pK}_{\text{A}2} = 6,0$ (бічний ланцюг), $\text{pK}_{\text{A}3} = 9,1$ (аміногрупа). Намалюйте структуру всіх форм гістидину присутніх при рН = 7,4 та розрахуйте їх відсотковий вміст.

101. Як збільшення вмісту CO_2 в атмосфері впливає на рН морської води і при чому тут корали?

Приклад 2:

Розрахуйте рН 200 мМ розчину оцтової кислоти ($\text{pK}_a = 4,76$).

Розв'язок:

Перевіряємо чи можна застосувати наближену формулу:

$C = 0,2 \text{ M} \gg (K_a = 10^{-4,76} = 1,73 \cdot 10^{-5} \text{ M})$, отже:

$\text{pH} = -(\text{pK}_a - \lg(0,2))/2 \approx 2,7$

Приклад 3:

pK_a одноосновної кислоти становить 4,3. Приблизно який її відсоток буде дисоційовано при $pH = 3$ й концентрації 5 мМ?

Розв'язок:

Оскільки $pK_a = 4,3$, то $K_a = 10^{-4,3} \approx 5,01 \cdot 10^{-5} \text{ М}$

Далі скористаємось означенням $K_a = [H^+][An^-]/[HAn] \rightarrow [An^-]/[HAn] = K_a/[H^+] = 5,01 \cdot 10^{-5} \text{ М} / 0,0075 \text{ М} = 0,01$.

Тобто аніонної форми кислоти приблизно 1% від загальної кількості.

- 102.** В розчині невідомої кислоти HA з $pH = 5$ міститься 5 мМ недисоційованої кислоти та 1 мМ її аніону. Знайдіть pK_a .
- 103.** Стеаринова кислота є основою господарського мила. Проте при $pH < 5$ її міцели втрачають стабільність й вона стає майже нерозчинною. Чому?
- 104.** Яка одноосновна кислота сильніша: та, у якої $K_a = 1 \text{ мкМ}$ чи та, що має $pK_a = 5,5$?
- 105.** Опишіть як можна приготувати 1 л 50 мМ буферного розчину HEPES з $pH 7,7$ якщо в наявності є в достатку 0,2 М розчину протонowanego HEPES, 0,1 М HCl , 0,1 М $NaOH$, 0,1 М Na_2HPO_4 та води.
- 106.** Який pH 1 мМ розчину етиламіну, якщо pK_a його спряженої кислоти становить 10,7?
- 107.** pK_a ацетилсаліцилової кислоти 2,97. Яка її константа дисоціації?
- 108.** До 100 мл 100 мМ фосфатного буферу з $pH=7,5$ додали 1 краплину (100 мкл) концентрованої HCl (37%). До якої величини опуститься pH розчину?
- 109.** Який об'єм 10 мМ розчину $NaOH$ потрібно для нейтралізації 10 мл 17 мМ розчину HCl ?
- 110.** Який об'єм 100 мМ розчину Na_2CO_3 потрібно для нейтралізації 10 мл 1% розчину HCl ?

Середній рівень**Приклад 4:**

Змішали 100 мл розчину $NaOH$ з $pH = 10$ та 100 мл розчину $NaOH$ з $pH = 12$. Який буде pH утвореного розчину.

Розв'язок:

Перший розчин (з $pH = 10$) містить $[OH^-] \approx 10^{-(14-10)} = 0,0001 \text{ М}$ $NaOH$, а другий ($pH=12$) - 0,01 М. Після змішування концентрація становитиме $(0,0001 \text{ М} \cdot 100 \text{ мл} + 0,01 \text{ М} \cdot 100 \text{ мл}) / (100 \text{ мл} + 100 \text{ мл}) = 0,0101 \text{ М} / 2 \approx 0,005 \text{ М}$.

Відповідно $pH = 14 - pOH = 14 + \lg 0,005 \approx 11,7$.

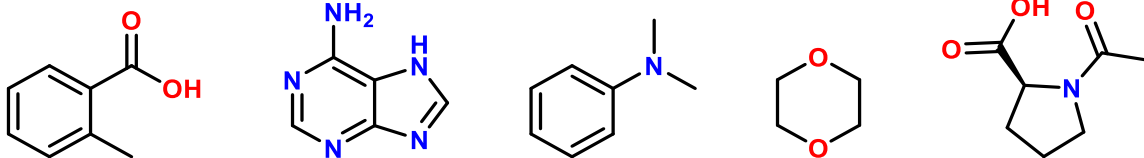
111. Змішали 100 мл розчину NaOH з рН = 10 та 10 мл розчину NaOH з рН = 12. Який буде рН утвореного розчину?

112. Змішали 100 мл розчину NaOH з рН = 11 та 100 мл розчину HCl з рН = 2. Який буде рН утвореного розчину?

113. Змішали 100 мл розчину оцтової кислоти з рН = 5 та 5 мл розчину HCl з рН = 5. Оцініть рН утвореного розчину.

114. 10 мМ розчин одноосновної органічної кислоти має рН = 5. Оцініть її константу дисоціації.

115. Які з наведених нижче сполук будуть краще розчинятися у лужному середовищі, які – в кислотному, а які мало змінювати розчинність залежно від рН?



116. Який об'єм 1 М оцтової кислоти потрібно додати до 1 л води, щоб рН утвореного розчину досяг 4?

117. Певну кількість бензойної кислоти розчинили в дистильованій воді й отримали розчин з рН = 5. Оцініть її концентрацію та те, яка її частина дисоційована за таких умов ($pK_a(\text{Ph-COOH})=4,2$).

118. У вас є два буфери з рН=8 : 10 мМ HEPES і 10 мМ TRIS. Який з них менше змінить рН при додаванні 1 мМ NaOH?

119. Вам потрібно підібрати рН = 5,5 буфер який менше змінюватиме рН при додаванні малих кількостей кислоти. Який з цих буферів краще обрати: ацетатний, фосфатний, TRIS ?

120. Студент приготував розчин NaCl з концентрацією 150 мМ і виміряв його рН при кімнатній температурі ($pH_{25^\circ\text{C}} = 7$). Потім він нагрів його до 50°C . Яка буде концентрація іонів водню в підігрітому розчині? При 50°C іонний добуток води $[\text{H}^+][\text{OH}^-] = 5,5 \cdot 10^{-14} (\text{M}^2)$.

Приклад 5:

Оцініть рН розчину, який утвориться, якщо змішати 100 мл 100 мМ розчину гідрофосфату натрію й 300 мл 100 мМ розчину дигідрофосфату натрію.

Розв'язок:

Шукаємо pK_a фосфатної кислоти, що відповідає за реакцію $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$: $pK_{a2} = 7,2$

Рахуємо рН по наближеній формулі $pH = pKa + Lg \frac{[An^-]}{[HAn]} = 7.2 + Lg \frac{25mM}{75mM} = 6.72$

121. Скільки приблизно потрібно додати 1 М NaOH до 100 мл 100 мМ фосфатного буферу з рН=6,8, щоб отримати рН = 7,4?

122. 10 мг бензойної кислоти (MW = 122 г/моль, рКа = 4,2) розчинили в 100 мл 10 мМ фосфатного буферу рН = 7,4. Оцініть рН утвореного розчину з точністю ±0,1.

123. При розведенні розчину кислоти А у воді в 10 раз рН зріс на 1, а у випадку кислоти В – тільки на 0,75. Що могло б бути причиною такої різниці?

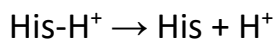
124. На скільки сильно зміниться рН 10 мМ та 100 мМ TRIS буферів з рН = 7,9 при додаванні до них 1 мМ розчину сильної кислоти?

125. В кювету з 1 мл дистильованої води додали 50 мкл 20 мМ розчину АТФ у воді. Яким стане рН розчину коли АТФ прогідролізує до АДФ на 10%?

Приклад 6:

рКа спряженої кислоти бічного ланцюга гістидину становить 6,5. Який відсоток залишків кожної з цих амінокислот в протеїні протонований при фізіологічному рН 7,4?

Розв'язок:



$$K = [\text{H}^+][\text{His}]/[\text{His-H}^+]$$

$$[\text{His-H}^+]/[\text{His}] = [\text{H}^+]/K$$

$$pKa = -\lg K = 6,5 \rightarrow K = 10^{-6,5} \approx 3,16 \cdot 10^{-7}$$

$$[\text{H}^+] = 10^{-7,4} \approx 3,98 \cdot 10^{-8}$$

$$[\text{His-H}^+]/[\text{His}] = [\text{H}^+]/K \approx 0,125.$$

Тобто протонованого гістидину приблизно 12,5% від непротонованого. Щоб порахувати відсоток від усього гістидину підставимо $[\text{His-H}^+] = 0,125 \cdot [\text{His}]$.

$$[\text{His-H}^+]/([\text{His}] + [\text{His-H}^+]) = [\text{His-H}^+]/([\text{His}] + 0,125[\text{His}]) = 0,125/(1+0,125) \approx 11,1\%$$

126. рКа фенольної групи тирозину в протеїнах становить близько 9,8. Який рН потрібен для депротонування 1% залишків цієї амінокислоти в протеїні?

127. Депротонувана сульфідна група цистеїну легко окислюється в дисульфід на повітрі. Для сповільнення окислення протеїнів, що його містять, розчин протеїну можна підкислити. В скільки разів буде відрізняться концентрація депротонованого цистеїну при рН = 7,4 та рН = 6? рКа сульфідної групи цистеїну 8,6.

128. Василь та Оксана визначали вміст кислоти в квасному молоці. Оксана ж взяла 10 мл збовтаного молока, додала до нього 20 мл дистильованої води та відтитрувала 3,7 мл 0,1 М розчину NaOH. Василь сильно й довго збовтував

молоко, взяв 20 мл, вилив у нього не відміряючи приблизно 50-100 мл води з-під крану й відтитрував тим самим 0,1 М розчином NaOH. В яких на вашу думку межах має бути об'єм, який пішов у нього на титрування? Якщо в молоці кислотність забезпечується тільки молочною кислотою, то який її відсотковий вміст?

Складніші завдання

129. Дослідник планує працювати з 100 мкМ розчином протеїну X, який містить 8 основних та 15 кислотних залишків. Яку мінімальну концентрацію буферу (HEPES, $pH = 7,5$) потрібно взяти, щоб при додаванні розчину протеїну в дистильованій воді до нього pH змінився менше, ніж на 0,05?

130. Намалюйте схематично криву титрування фосфатної кислоти (pH як функція кількості доданого лугу). Вкажіть точки перегинів.

131. В активному центрі протеїну наявні гістидин (pK_a бічного ланцюга 6,5) та цистеїн (pK_a бічного ланцюга 8,6). Для активності ферменту потрібно щоб гістидин був не протонований, а цистеїн – навпаки, в кислотній (-SH) формі. При якому pH варто очікувати максимальну активність цього ферменту? Намалюйте схематично відношення активності від pH враховуючи тільки цю кислотно-основну рівновагу.

132. Намалюйте схематично криві титрування гліцину та ацетатної кислоти на одному графіку (pH як функція кількості доданого лугу). Вкажіть точки перегинів.

133. Який pH 10 нМ розчину NaOH? (врахуйте дисоціацію води)

134. В кювету з 1 мл 10 мМ TRIS буферу ($pH = 7,4$) додали 50 мкл 20 мМ розчину АТФ у воді. Яким стане pH розчину, коли АТФ прогідролізує на 1%? На 99%? $pK_a(\text{Tris}) = 8,3$.

135. В якому з розчинів pH зміниться сильніше при додаванні 1 мМ NaOH:
а) 10 мМ фосфатний буфер $pH = 7,1$; б) 20 мМ фосфатний буфер $pH = 7,7$;
в) 10 мМ TRIS буфер $pH = 7,7$ г) 5 мМ HCl?

136. Студент приготував 10 мг/мл розчин α -кетоглутарової кислоти. Для цього він додав наважку кислоти в дистильовану воду. Оцініть pH утвореного розчину з точністю $\pm 0,2$. Який приблизно об'єм 10 мМ розчину буде потрібно, щоб довести pH утвореного розчину до 7?

137. pH поверхневих шарів вод океанів переважно визначається вмістом CO_2 в атмосфері. За останні кілька десятиліть вміст CO_2 зріс від 0,031 до 0,043%. Оцініть порядок величини зміни pH викликаної цим. Швидкість руйнування певних коралових рифів пропорційна концентрації іонів водню в воді. Оцініть в скільки разів змінилась вона.

2. Термодинаміка

Закони термодинаміки. Теплота й ентальпія реакції. Ентропія. ΔG . Рівняння Нернста. Електрохімічний потенціал. Закон Гесса. Константи рівноваги. Визначення K_d і стехіометрії при взаємодіях протеїнів.

2.1. Константи рівноваги

Пам'ятка:

- Принцип Ле Шательє: якщо на систему, що перебуває в термодинамічній рівновазі подіє будь-яке збурення, то рівновага зміститься так, щоб його мінімізувати. Наприклад, зниження тиску стимулює реакції, в яких виділяються гази, а підвищення температури – ендотермічні процеси.
- Для реакції $A + B \rightleftharpoons D$

Константа рівноваги: $K = \frac{[D]}{[A] \cdot [B]}$; Константа дисоціації: $K_d = \frac{[A] \cdot [B]}{[D]}$;

$$\frac{[D]}{[D]+[A]} = \frac{K_d + [A] + [B] - \sqrt{(K_d + [A] + [B])^2 - 4[A][B]}}{2[A]}$$

Якщо в початковий момент часу речовина D була відсутня то $[A]+[D] = [A]_0$;

$[B]+[D]=[B]_0$

Ступінь перетворення A: $[D]/([A]+[D])$

Обов'язковий рівень

Приклад 1

Константа дисоціації комплексу F-I між інгібітором I та ферментом F становить $K_d = 7 \text{ мкМ}$. Який відсоток ферменту F буде зв'язано з інгібітором, якщо до 100 нМ розчину F додати I до в концентрації 10 мкМ?

Розв'язок:

$$K_d = \frac{[F] \cdot [I]}{[F-I]} = 7 \text{ мкМ}$$

$[F]+[F-I] = 100 \text{ нМ} = 0,1 \text{ мкМ}$

Концентрація інгібітора набагато більша за концентрацію ферменту, отже можна вважати, що зв'язування частини інгібітора з ферментом не сильно її змінить $[I] \gg [F] \rightarrow [I] \approx [I]_0 = 10 \text{ мкМ}$

Нехай

$$[F] = x, \text{ тоді } [F-I] = 0,1-x$$

$$\frac{[F]*[I]}{[F-I]} = Kd \rightarrow$$

$$\frac{x*10}{0,1-x} = 7 \rightarrow$$

$$10 * x = 7 * (0,1 - x) \rightarrow$$

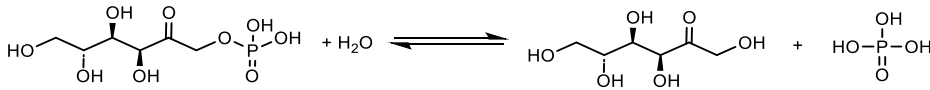
$$x \approx 0,041$$

Тобто концентрація вільного ферменту 0,041 мкМ (41% від загальної кількості)

- 138.** В стані рівноваги $[A] = 10 \text{ нМ}$, $[B] = 30 \text{ нМ}$, $[C] = 200 \text{ нМ}$. Розрахуйте константу рівноваги реакції $A + B \rightleftharpoons C$ та зверніть увагу на її розмірність.
- 139.** Яка константа рівноваги реакції $A + B \rightleftharpoons 2C$, якщо при $[A]=20 \text{ нМ}$, $[B]=30 \text{ нМ}$, $[C]=40 \text{ нМ}$ система перебуває в стані рівноваги?
- 140.** Константа рівноваги реакції $A + B \rightleftharpoons C + D$ становить 4,56. В розчині наявна така концентрація речовин: $[A] = 8 \text{ мкМ}$, $[B] = 2 \text{ мкМ}$, $[C] = 120 \text{ нМ}$. Яка концентрація речовини D?
- 141.** Константа дисоціації димеру протеази X становить 10 нМ. Концентрація димеру у розчині становить 1 мкМ. Яка приблизно концентрація мономеру?
- 142.** Яка розмірність константи рівноваги реакції $ATP + GMP \rightleftharpoons ADP + GDP$?
- 143.** До розчину ензиму (10 нМ) додали інгібітор до фінальної концентрації 2 мкМ. Який приблизно відсоток ензиму буде зв'язано з інгібітором, якщо константа дисоціації комплексу ензим-інгібітор становить 1 мкМ ?
- 144.** При розчиненні певної гексози у воді (1 мМ) 6% перебуває у відкритій формі. Розрахуйте константу рівноваги між закритою й відкритою формами. Яка частка буде у відкритій формі при 10 мМ концентрації?
- 145.** При 1 мкМ концентрації протеїну M у воді 10% молекул переходить у димерну форму, а решта залишається мономерами. Розрахуйте константу рівноваги (Kd). Яка частка буде у мономерній формі при розчиненні 100 мкМ цього протеїну?
- 146.** Константа дисоціації димерного протеїну становить $9 \pm 1 \text{ мкМ}$. Який відсоток буде перебувати в димерній формі в розчині з концентрацією 1 мг/мл? Молекулярна маса мономеру – 75кДа.
- 147.** В розчині з концентрацією 1 мг/мл певної гептози у відкритій, α та β формі перебуває 7%, 25% та 68%, відповідно. Розрахуйте константи рівноваги перетворень між цими формами.
- 148.** Kd комплексу фермент-інгібітор становить 5 мкМ, а сумарна концентрація ферменту 0,1 мкМ. Яка концентрація інгібітора дозволить зв'язати 50, 90, 99% ферменту?

149. Обчисліть який відсоток рецепторів зв'язані з лігандом, якщо концентрація вільного ліганду становить 1 мМ, а K_d зв'язування з рецептором – 2 мМ.

150. Ензиматичний гідроліз 0,1 М розчину фруктози-1-фосфату зупинився коли його концентрація впала до 0,055 мМ. Розрахуйте константу рівноваги реакції.



Середній рівень

151. Клітини вигаданої лінії PNU-IF містять по 700-1200 рецепторів, що взаємодіють з пептидом EGF ($K_d=700\pm 150$ нМ). Концентрація вільного EGF у розчині становить 5 мМ. Оцініть, скільки рецепторів буде активовано (зв'язано з EGF) на клітину.

152. Фермент E активується при зв'язуванні з регуляторним білком R, формуючи комплекс E·R (константа дисоціації комплексу становить $K_d=500$ нМ). Активність ферменту E також контролює й інший регуляторний білок, I, який зв'язується з ним з $K_d = 200$ нМ в неактивний комплекс. Яка буде концентрація вільного ферменту E та активованої форми (E·R) в розчині, в якому змішали по 1 мкМ E, R та I?

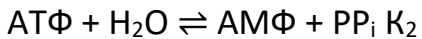
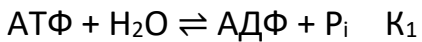
153. Гомодимерний білок P має два незалежні сайти зв'язування для малого ліганду L. Константи дисоціації для першого та другого зв'язування відрізняються і становлять 100 нМ та 500 нМ відповідно (для другої молекули зв'язування слабше). Розрахуйте концентрацію ліганду L, необхідну щоб половина доступних сайтів зв'язування була заповнена лігандом (середня кількість зв'язаних молекул ліганду на одну молекулу білка P становила 1), якщо початкова концентрація P у розчині 1 мкМ. Яка частка білка P буде повністю насичена L за цих умов?

154. Під час курсової роботи студент вивчав інгібуючу дію синтетичного пептиду на одну з протеаз. Його результати показали що 50 нМ розчин інгібітора зменшує швидкість ферментативної реакції в 3 рази, а 100 нМ розчин – у 8 разів. В експериментах студент використовував 100 нМ концентрацію ферменту, а початкова концентрація субстрату була 1 мМ. Чи відповідають такі результати простій моделі зв'язування 1:1 інгібітору з ферментом й переведенням його в неактивну форму? Чи є ще якісь причини сумніватися в достовірності отриманих даних?

155. При вирощуванні клітинних культур часто використовується атмосфера, що містить 5% вуглекислого газу, оскільки він діє як буфер для підтримання рН у фізіологічному діапазоні, необхідному для росту клітин. Для цього в розчин додають приблизно 2,5 г/л гідрокарбонату натрію. Напишіть, які рівноваги

важливі в такій системі та вираз залежності рН середовища від вмісту CO_2 в повітрі та відповідних констант рівноваг.

156. АТФ може гідролізуватися до АДФ та фосфат-іону, або до АМФ та пірофосфат-іону.



Напишіть вираз який пов'язує відношення концентрацій $[\text{АМФ}]/[\text{АДФ}]$ в розчині з відношенням концентрацій фосфат та пірофосфат катіонів.

157. До розчину двониткової ДНК в концентрації 10 мкг/мл додали 2 мкМ 20-амінокислотного пептиду багатого на лізини. Зв'язаним виявилось більше 99% пептиду. Коли ж пептиду додали 10 мкМ, то зв'язаним було тільки 59%. Що можна сказати про константу зв'язування та стехіометрію взаємодії на основі цих даних? Вважайте, що середня маса нуклеотиду становить 330 г/моль.

158. Протеаза PR (28 кДа) є активною димерній формі (K_d димеру становить 150 нМ ($\text{PR}_2 \rightleftharpoons 2\text{PR}$)). До 20 мкг/мл розчину PR додали 100 нМ антитіла А, яке міцно зв'язується з мономерною протеазою ($K_d \approx 1$ нМ) утворюючи комплекс PR-А, який не здатен до димеризації та не має каталітичної активності. Оцініть на скільки при цьому знизилась концентрація активної димерної форми протеази.

159. Група хіміків розробила сполуку АСА, яка селективно зв'язується до капсидного протеїну вірусу ВІЛ-1 з $K_d = 8$ нМ та робить його нефункціональним. Наступним етапом був тест цього препарату на культурі клітин, уражених вірусом. Оцініть величину IC_{50} (концентрацію інгібітора потрібну для деактивації 50% протеїну), якщо концентрація капсидного протеїну на стадії дозрівання віріонів становить 25 мкМ.

160. При розробці ліків інколи потрібно виміряти афінність інгібітора до фермента, яка є в наномолярному діапазоні. Зробити це напряму доволі важко експериментально, бо при низьких концентраціях багато методів вимірювання дають низький чи шумний сигнал. Тому в таких випадках застосовують конкурентний підхід: дивляться наскільки легко інгібітор, який нас цікавить, витісняє сполуку, що має проміжну афінність, але наявна у вищих концентраціях. Фермент F зв'язується з сполукою С з $K_d = 1$ мкМ. Якщо до розчину, що містить 1 мкМ F та 10 мкМ С додати 100 нМ I, то з ферментом зв'яжеться тільки половина доданої кількості. Оцініть константу дисоціації комплексу між інгібітором (I) та ферментом (F). Скільки відсотків I зв'язалося б з F за таких умов, якщо б в розчині не було конкурента С?

Складніші завдання

Приклад 2

0,1 мкМ розчин протеїну Р титрували коферментом С, який зв'язується з ним у комплекс складу 1:1. Залежність частки зв'язаного Р від сумарної концентрації доданого С має такий вигляд. Розрахуйте константу зв'язування

[C] _{add}	0,03	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
[P] _{bound} /([P] _{bound} + [P] _{free})	0,078	0,145	0,275	0,431	0,511	0,63

Розв'язок: Спрощений варіант

Розраховуємо концентрацію вільного та зв'язаного протеїну та коферменту в кожній з точок:

$$[P]_{\text{bound}} = (\text{загальна концентрація протеїну, } 0,1 \text{ мкМ}) \cdot (\text{частка зв'язаного})$$

$$[P]_{\text{free}} = (\text{загальна концентрація протеїну}) - [P]_{\text{bound}}$$

$$[C]_{\text{bound}} = [P]_{\text{bound}} \text{ (бо за умовою взаємодія 1:1)}$$

$$[C]_{\text{free}} = [C]_{\text{add}} - [P]_{\text{bound}}$$

[C] _{add}	0,03	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
[P] _{bound} /([P] _{bound} + [P] _{free})	0,078	0,145	0,275	0,431	0,511	0,63
[P] _{bound} , мкМ	0,0078	0,0145	0,0275	0,0431	0,0511	0,063
[P] _{free} , мкМ	0,09922	0,09855	0,09725	0,09569	0,09489	0,0937
[C] _{free} , мкМ	0,0222	0,0355	0,0725	0,1069	0,1489	0,187
Kd=[P] _{free} ·[C] _{free} /[P] _{bound}	0,282395	0,241278	0,256386	0,237338	0,276499	0,278125

Бачимо, що у всіх експериментальних точках концентрації вільного протеїну та коферменту співрозмірні й жодна з них не близька до 0. Це дозволяє припустити, що відсоток зв'язаного протеїну у всіх точках оцінено коректно. Тому приблизне значення Kd можна отримати усередненням Kd у всіх експериментальних точках. Kd ≈ 0,26 мкМ

161. В синтетичному аналозі гемоглобіну SYH зв'язування кисню кооперативне – друга молекула зв'язується втричі краще за першу (K_{d1} = 45 мкМ, K_{d2} = 15 мкМ). При якій концентрації кисню середнє насичення становитиме 50% (половина сайтів зв'язування будуть заповнені)? Намалюйте схематично залежність кількості зв'язаних молекул кисню від концентрації кисню у розчині та покажіть, в чому її відмінність від кривої для протеїну з одним сайтом зв'язування, що має таку ж концентрацію насичення на 50%.

162. Поясніть як кооперативність зв'язування дозволяє сигнальним білкам бути більш чутливими до невеликих коливань концентрації їх лігандів.

163. 0,1 мкМ розчин протеїну Р титрували коферментом С. Залежність частки зв'язаного Р від сумарної концентрації доданого С має такий вигляд. Розрахуйте константу зв'язування.

$[C]_{\text{add}}$	0	0,03	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
$[P]_{\text{bound}}/([P]_{\text{bound}}+[P]_{\text{free}})$	0	0,281	0,453	0,791	0,916	0,951	0,973

164. Протеїн α -синуклеїн (MW = 14.4 кДа) відомий тим, що під час хвороби Паркінсона утворює амілоїдної фібрили – довгі агрегати впорядкованої структури. Відомо, що константа дисоціації мономерного протеїну від кінця такої фібрили становить 300 ± 100 нМ. Що трапиться, якщо 1 мг амілоїдних фібрил α -синуклеїну розчинити в 10 мл буферного розчину і дочекатися встановлення рівноваги?

165. ► Група хіміків розробила інгібітор протеази вірусу ВІЛ-1, що здатен оборотно зв'язуватися з нею ($K_d = 7$ нМ) в розчині й повністю блокувати активність. Проте, в експериментах на культурах клітин цей інгібітор не показав помітного ефекту в концентраціях до 1 мкМ. Виявилось, що він також здатен зв'язуватися з кількома іншими клітинним протеїнами, зокрема з тубуліном (K_d комплексу 120 нМ). Припустіть, що інгібітор ідеально проникає в клітини та реагує тільки з цими двома протеїнами та що концентрація ВІЛ-1-протеази в клітині 10 нМ, а тубуліну 20 мкМ. Оцініть, яка концентрація інгібітора потрібна, щоб деактивувати половину протеази.

166. Щоб вивчити взаємодію двох цитозольних протеїнів А та В дослідники приготували їх моноцистеїнові мутанти, промітили двома різними флуоресцентними барвниками та оцінювали їх взаємодію по зміні FRET. Для цього в кювету з 500 мкл 10 мМ фосфатного буферу, що містив 150 мМ NaCl додали 2 мкл 10 мкМ А та титрували 4 мкМ розчином В. У таблиці наведено нормалізовану інтенсивність флуоресценції А – величину, що змінюється лінійно з часткою зв'язаного А як функцію сумарного об'єму доданого розчину В (яке значення відповідає повному зв'язуванню наперед не відомо). Розрахуйте константу зв'язування вважаючи, що стехіометрія взаємодії 1:1.

$[V]_{\text{add}}$, мкл	0	2	4	6	8	10	12	15	20	25	30
I/I_0	1	0,962	0,915	0,878	0,851	0,852	0,846	0,826	0,794	0,773	0,756

167. 1 мкМ розчин 55-амінокислотного нуклеокапсидного протеїну вірусу ВІЛ-1 об'ємом 500 мкл титрували 10 мкМ розчином 55-нуклеотидного некодуючого фрагменту РНК цього вірусу. За реакцією спостерігали по зростанню інтенсивності флуоресценції триптофану на протеїні. Оцініть константу зв'язування та стехіометрію взаємодії.

V_{add} , мкл	0	2	4	6	8	10	15
Частка зв'язаного протеїну	0	0,25	0,5	0,7	0,88	0,95	0,98

2.2. Функції стану та теорія термодинаміки

Пам'ятка:

- В ізольованих системах загальна енергія залишається сталою при будь-яких процесах (перший закон термодинаміки)
- Системи завжди прямують до менш впорядкованого стану. "Тепло йде від гарячого до холодного" (другий закон термодинаміки)
- Ентропія (S) – міра невпорядкованості системи. Якщо під час реакції ΔS від'ємна, то система стає більш впорядкованою. Розмірність Дж/(моль·К).
- Для одного об'єкту $S = k \ln \Omega$, де k – стала Больцмана, а Ω – кількість можливих станів.
- Ентропія системи в найбільш впорядкованій формі ОК рівна 0. ОК це коли безпорядку немає зовсім $S \rightarrow 0$.
- Ентальпія (H) – показник збереженого внутрішнього тепла в системі. Якщо під час реакції ΔH від'ємний, то вона екзотермічна. Розмірність Дж/моль або кал/моль
- Мірою того скільки роботи може виконати система є вільна енергія ΔG . Процес спонтанний, якщо його ΔG негативна.
- $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
- ΔG при поточних концентраціях, а ΔG^0 – при стандартних концентраціях (все по 1 моль/л)
- $\Delta G^{\circ'}$ – зміна вільної енергії реакції при рН=7. (на відміну від ΔG^0 , яке розраховується при стандартних умовах коли $[H^+] = 1 \text{ M}$)
- Для реакції $A \rightleftharpoons B$ $\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln [A]/[B]$
- Функція стану – будь-який параметр системи, який залежить тільки від її поточного стану, а не від того, яким чином вона до нього прийшла. Прикладами функцій стану є ΔG , ΔH , ΔS , T
- Закон Гесса — тепловий ефект хімічної реакції не залежить від шляху реакції, а лише від початкового й кінцевого станів системи. В більш широкому розумінні застосовується також до інших функцій стану. Є прямим наслідком першого закону термодинаміки.

Обов'язковий рівень

- 168.** Для реакції $A \rightarrow B$ при 37°C (310 K) зміна ентальпії становить $-7\text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$, а зміна ентропії становить $-25\text{ Дж}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{моль}^{-1}$. Чи є реакція спонтанною?
- 169.** Оцініть ΔG реакції розкриття циклу гексози, якщо у водному розчині 98% знаходиться у циклічній формі.
- 170.** Для системи $A + B \rightleftharpoons C$ рівноважні концентрації становлять $[A] = 1\text{ мМ}$, $[B] = 2\text{ мМ}$, $[C] = 3\text{ мМ}$. Оцініть константу рівноваги та ΔG° реакції.
- 171.** Для реакції $A \rightleftharpoons B$ ΔG° становлять 10 кДж/моль . Яка фактична зміна енергії Гібса (ΔG) в умовах коли $[A] = 10\text{ мМ}$, $[B] = 1\text{ мМ}$?
- 172.** Що ви можете сказати про ΔH та ΔS таких процесів: випаровування води при 30°C ; згортання протеїну у нативну конформацію; розчинення цукру в воді при 90°C ?
- 173.** Глюкозо-6-фосфат може перетворюватися в фруктозо-6-фосфат при дії фосфоглюкозоізомерази. Оцініть ΔG° реакції, якщо константа рівноваги при 37°C становить 0,5.
- 174.** Гідроліз зайвої фосфатної групи від ліпиду є спонтанним ($\Delta G^\circ < 0$), але повільним процесом. Додавання специфічного ферменту прискорює його в 2000 разів. Оцініть як змінюється при цьому константа рівноваги, якщо ферментативна реакція не є спряженою з іншими?

Середній рівень

- 175.** ΔG° реакції ізомеризації глюкоза-1-фосфату (G1P) в глюкоза-6-фосфат (G6P) за певних умов становить $-7\text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$. Оцініть співвідношення $[G1P]/[G6P]$ за рівноваги при таких умовах.
- 176.** ΔG° реакції гідролізу АТФ за стандартних умов ($\text{pH } 7$, 25°C) становить -31 кДж/моль . Розрахуйте ΔG° для умов більш типових у живих клітинах: 1 мМ АТФ , $0,1\text{ мМ АДФ}$, 10 мМ фосфат .
- 177.** Аденілатциклаза каталізує утворення циклічного АМФ (цАМФ) з АТФ: $\text{АТФ} \rightarrow \text{цАМФ} + \text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (PPi) $\Delta G^\circ \approx 6,8\text{ кДж/моль}$. ΔG° для гідролізу АТФ до АМФ становить $-33,5\text{ кДж/моль}$. Чому дорівнює ΔG° для гідролізу цАМФ до АМФ та в яку сторону зсунута рівновага цієї реакції в 1 мМ розчині цАМФ у воді?
- 178.** Розрахуйте різницю вільної енергії обумовлену трансмембранним градієнтом концентрації арабінози, якщо концентрація з внутрішньої сторони мембрани 1 мМ , а з зовнішньої – 50 мкМ .
- 179.** Розрахуйте зміну вільної енергії проникнення глюкози в клітину, якщо її позаклітинна концентрація 10 мМ , а внутрішньоклітинна – 2 мМ .

180. ΔG° реакції гідролізу АТФ за стандартних умов (рН 7, 25°C) становить -31 кДж/моль. В клітинах певної лінії [АТФ]=3 мМ, [АДФ]= 1 мМ, [фосфат]=5 мМ. Оцініть, скільки енергії можна отримати за рахунок гідролізу 1 моля АТФ за таких умов (ΔG) ?

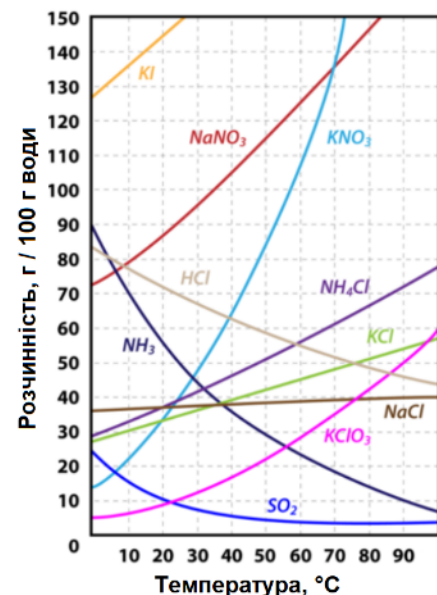
181. Хімік та біолог вивчали реакцію Глюкоза + Рі → Глюкозо-6-фосфат при 25°C, [Глюкоза] = 10 мМ, [Глюкозо-6-фосфат]= 1 мМ, [Рі]= 10 мМ, рН =7. Хімік отримав значення $\Delta G^\circ = +16$ кДж/моль і $\Delta G = 21,7$ кДж/моль. А біолог $\Delta G^\circ = +14$ кДж/моль і $\Delta G = 19,7$ кДж/моль. Чому виникла розбіжність в значеннях. Чи допустили вони помилки в розрахунках?

182. Однією з стадій синтезу кардіоліпінів є активація фосфатидної кислоти ЦТФ (цитозинтрифосфатом). Це пара спряжених реакцій: Фосфатидна кислота + ЦТФ → диацилгліцерол-ЦДФ + фосфат $\Delta G^\circ = -19$ кДж/моль
 Диацилгліцерол-ЦДФ + гліцерол-3-фосфат → Фосфатидилгліцерол + ЦМФ $\Delta G^\circ = 1$ кДж/моль
 Чи буде сумарна реакція енергетично вигідною? Чи була б енергетично вигідна друга реакція, якщо концентрації диацилгліцерол-ЦДФ в 1000 раз нижча за концентрацію фосфатидилгліцеролу, а концентрації гліцерол-3-фосфату та ЦМФ співрозмірні?

183. Константа рівноваги K_{eq} для реакції $A \rightleftharpoons B$ при 37 °C становить 10000. У клітинах речовина А постійно утворюється в іншому процесі й витрачається в цій реакції. Її квазістаціонарна концентрація 1 мМ, а квазістаціонарна концентрація В рівна 10 мМ. Оцініть ΔG для перетворення $A \rightarrow B$ в клітині за таких умов.

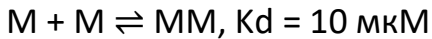
184. Протеїн А може перебувати в нативній (Н) та патогенній (П) формах, які відносно швидко і оборотно переходять одна в одну. Відомо, що при 37°C в людському організмі 99,9% протеїну А перебуває в нативній формі. Оцініть, яка частка протеїну буде в патогенній формі при підвищенні температури тіла до 40°C, якщо експеримент *in vitro* показав що при 4°C частка нативної форми падає до 90% (так звана денатурація при охолодженні).

185. На графіку наведено залежність розчинності деяких неорганічних речовин від температури. Як ви гадаєте, при розчиненні 1 г якої з цих речовин розчин охолоджуватиметься найсильніше?



Складніші завдання

186. Для одного з протеїнів, який у нативній формі є тримером, константа димеризації



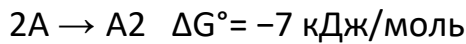
суттєво відрізняється від константи приєднання третього мономеру



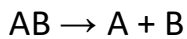
Оцініть ΔG° цих реакцій і запропонуйте причину такої розбіжності.

Приклад

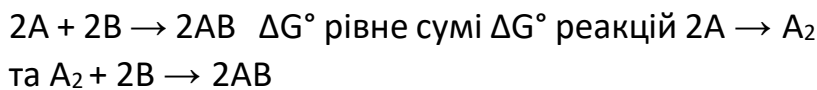
Відомо такі параметри реакцій



Чому рівна ΔG° реакції



Розв'язок: ΔG° реакції утворення AB напряму з A і B та через утворення проміжного димеру A_2 повинна бути ідентична. Отже для реакції

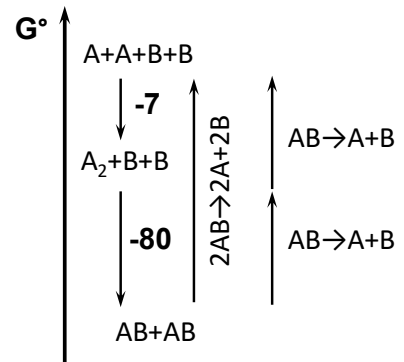


$$\Delta G^\circ = -7 + (-80) = -87 \text{ кДж/моль}$$

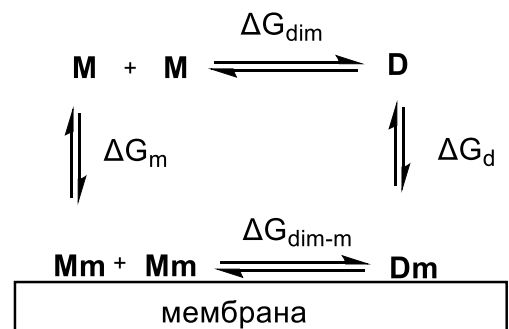
Реакція $A + B \rightarrow AB$ є тотожною реакції $2A + 2B \rightarrow 2AB$ тільки з вдвічі меншою кількістю речовини.

Відповідно її ΔG° вдвічі нижче: $\Delta G^\circ = -87/2 = -43,5 \text{ кДж/моль}$

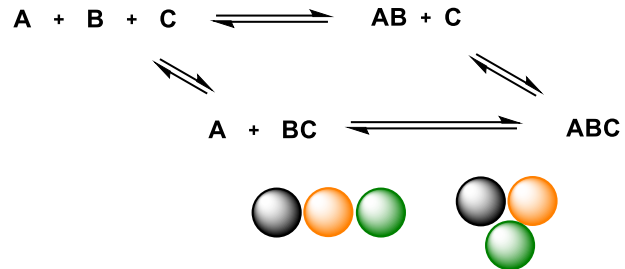
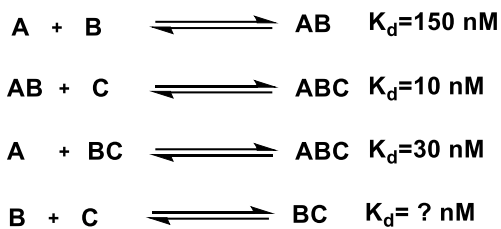
Оскільки реакція $AB \rightarrow A+B$ є оберненою до $A + B \rightarrow AB$, то її ΔG° таке ж, але з протилежним знаком. $\Delta G^\circ = -(-43,5 \text{ кДж/моль}) = 43,5 \text{ кДж/моль}$



187. Нативною формою протеїну M є мембранно-зв'язаний димер Dm. Він може утворюватися або димеризацією мономеру зв'язаного з мембраною, або через димеризацію у розчині та наступне зв'язування мономеру з мембраною. Відомо, що ΔG° реакції димеризації у розчині становить -1 кДж/моль , а на мембрані -2 кДж/моль . ΔG° зв'язування мономеру до мембрани -3 кДж/моль . Розрахуйте ΔG° зв'язування димеру до мембрани.



188. Гетеротример ABC утворюється з протеїнів A, B, C. Відомо, що константа дисоціації комплексу AB становить 150 нМ, а константи дисоціації протеїнів A та C від гетеротримеру – 30 та 10 нМ, відповідно. Розрахуйте константу дисоціації комплексу протеїнів BC. Як ви гадаєте, такі дані більш характерні для лінійної чи трикутної топології комплексу?



189. Під час хвороби Альцгеймера протеїн APP (amyloid precursor protein) неправильно розрізається протеазами внаслідок чого утворюється 42-амінокислотний пептид Aβ. Цей пептид самовільно агрегує в патогенні амілоїдні фібрили. Одна група дослідників повідомила, що флаваноїд EGCG в концентрації 250 нМ здатен дестабілізувати амілоїдні фібрили концентрацією 50 мкМ й викликати їх дизагрегацію на мономерний пептид. Яким принципом термодинаміки суперечить це твердження?

190. Вчені розробили 6-амінокислотний пептид, що здатен блокувати протеазу одного з вірусів. Проте, його зв'язування з нею було не достатньо сильне для практичного застосування ($K_d \approx 500 \text{ нМ}$). Щоб покращити афінність розглядають ідею зробити його циклічний аналог, що вже перебуває в потрібній конформації. Який теоретично можливий максимальний виграш в K_d це може дати за рахунок ентропійного фактору? Вважайте, що у розгорнутому стані пептид має в середньому 2 статистично доступні конформації на залишок, а в циклічному – одну. Скористайтесь формулою $\Delta S = R \cdot \ln(\text{станів після}/\text{станів до})$, яка отримана множенням $S = k \ln \Omega$ на число Авогадро.

2.3. Окисно-відновний потенціал та рівняння Нернста

- В окисно-відновних реакціях речовина чи іон, що віддає електрон(и) називається відновником, а що приймає – окисником. Прийнято записувати окремі *напівреакції*: віддавання й приймання електронів. Наприклад реакція $\text{Cu}^{2+} + \text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{Cu}$ записується як напівреакції $\text{Cu}^{2+} + 2e^- \rightarrow \text{Cu}$ та $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2e^-$
- Електрохімічний потенціал показує наскільки легко приймається електрон під час певного процесу. Його вимірюють в вольтах – напрузі яку може створити на електроді перехід електрону в певному процесі.

За 0 прийнято напругу переходу $H^+ + e^- \rightarrow 1/2 H_2$ при 1 М концентрації кислоти. Вона прямо пропорційна енергії переходу ($1V = Дж/кулон$).

- Спонтанно протікають процеси в яких електрони віддаються в півреакції з більш негативним потенціалом відновлення і приймаються у півреакції з більш позитивним потенціалом відновлення.

- Рівняння Нернста: $E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$

E та E^0 - електродний потенціал, та стандартний електродний потенціал, відповідно,

R - універсальна газова стала, 8,314 Дж/(моль·К);

T - абсолютна температура;

F - число Фарадея, 96485 Кл/моль;

n - кількість електронів, які беруть участь в електрохімічному процесі

Це рівняння є продуктом ділення на nF рівняння $\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$

Реакціям з негативним ΔG відповідає позитивний E : $\Delta G = -nF \cdot \Delta E$.

- В біології часто застосовують E_0' – стандартний відновний потенціал при $pH = 7$, $25^\circ C$ та концентрації відновлених та окислених продуктів 1М

Окислена форма	+ n e ⁻	+ m H ⁺	Відновлена форма	E_0' , мВ (при pH=7)	$\Delta E/\Delta pH$
			Сильніші відновники ↑		
NAD ⁺	+2 e ⁻	+1 H ⁺	NADH	-320	-30
Ліпоева кислота (S-S)	+2 e ⁻	+2 H ⁺	Ліпоева кислота (SH,SH)	-290	-60
Піруват	+2 e ⁻	+2 H ⁺	Лактат	-190	-60
Глутатіон (G-S-S-G)	+2 e ⁻	+2 H ⁺	Глутатіон (2× GSH)	-172 (при 10 мМ)	-60
Фумарат	+2 e ⁻	+2 H ⁺	Сукцинат	30	-60
Убіхінон	+2 e ⁻	+2 H ⁺	Убіхінол	4	-60
Цитохром С (ox) (Fe ³⁺)	+1 e ⁻		Цитохром С (red) (Fe ²⁺)	220	0
NO ₃ ⁻	+2 e ⁻	+2 H ⁺	NO ₂ ⁻ + H ₂ O	421	-60
Fe ³⁺	+1 e ⁻		Fe ²⁺	771	0
1/2 O ₂	+2 e ⁻	+2 H ⁺	H ₂ O	820	-60
Сильніші окисники ↓					

Обов'язковий рівень

Приклад 1

Стандартний електрохімічний потенціал напівреакцій
 $FAD + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2$ становить $E_0' = -0,219 V$,
 піруват + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ лактат $E_0' = -0,185 V$

Чи енергетично вигідне (спонтанне) відновлення пірувату в лактат при дії FADH_2 за стандартних умов?

Розв'язок:

Записуємо сумарне рівняння процесу

піруват + $\text{FADH}_2 \rightarrow$ лактат + FAD

бачимо що в реакції не задіяні протони, а кількість електронів, які віддає донор і приймає акцептор рівна. Тому

$$\Delta E_0' = \Delta E_0'(\text{акцептор}) - \Delta E_0'(\text{донор}) = -0,185 \text{ В} - (-0,219 \text{ В}) = 0,034 \text{ В}$$

Величина позитивна, тому реакція може протікати спонтанно.

191. Скористайтесь таблицею стандартних потенціалів напівреакцій й оцініть які з процесів можуть відбуватися спонтанно: а) окислення глутатіону (GSH) убіхіноном, б) відновлення NAD^+ цитохромом C_{red} , в) окислення FeSO_4 цитохромом C_{ox} .

192. В певній частині клітини вміст окисненої форми (NAD^+) вдесятеро вищий за вміст відновленої (NADH). Вважайте, що в даному середовищі встановилась термодинамічна рівновага між фумаратом та сукцинатом. Оцініть, чого буде більше і в скільки разів? $\text{pH} = 7$; $E^{0'}(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -0,32 \text{ В}$; $E^{0'}(\text{фумарат/сукцинат}) = +0,03 \text{ В}$.

193. Розрахуйте $\Delta G^{0'}$ реакції окислення ліпоевої кислоти убіхіноном при $\text{pH} = 7$ та при $\text{pH} = 9$.

194. Окисно-відновний потенціал цистеїну становить $E^{0'} = -220 \text{ мВ}$. В нього є аналог, селеноцистеїн, який входить до кількох ферментів, що каталізують окисно-відновні процеси, та має $E^{0'} = -480 \text{ мВ}$. Хто з них буде легше окиснюватися киснем повітря?

Середній рівень

195. Підтримка достатньої концентрації глутатіону є критично важливою для запобігання окислювальному стресу в мітохондріях. Це пов'язано з тим, що окисно-відновний потенціал реакції ($\text{GSSG} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{GSH}$) залежить від сумарної концентрації його окисненої й відновленої форми. Така залежність не характерна для більшості біологічних окисно-відновних реакцій, скажімо для пар фумарат/сукцинат чи NAD^+/NADH . Поясніть, що такого особливого в реакції окислення глутатіону та напишіть вираз для окисно-відновного потенціалу.

Приклад 2

Чи можливе відновлення пірувату в лактат при реакції з NADH при $\text{pH} = 5$, $\text{pH} = 7$, $\text{pH} = 9$?

Розв'язок:

Стандартний електрохімічний потенціал (рН = 7) напівреакцій:
 піруват + 2H⁺ + 2e⁻ → лактат становить E₀' = -190 мВ,
 NAD⁺ + H⁺ + 2e⁻ → NADH E₀' = -320 мВ

У випадку пірувату в реакції приймають участь 2 протони, тому потенціал змінюється на -60 мВ на одиницю рН. А у випадку NAD⁺ - один протон тому чутливість до рН менша, -30 мВ на одиницю рН.

Таким чином електрохімічний потенціал реакції становить

$$\Delta E_0 = \Delta E_0(\text{акцептор}) - \Delta E_0(\text{донор}) = (-190 - 60 \cdot (\text{pH} - 7)) - (-320 - 30 \cdot (\text{pH} - 7)) = 130 - 30 \cdot (\text{pH} - 7) \text{ мВ}$$

При рН = 5 → Δ E₀ = 130 - (30 · (5 - 7)) = 190 мВ – реакція термодинамічно вигідна

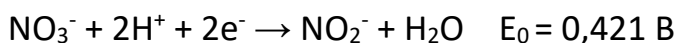
рН = 7 → Δ E₀ = 130 - (30 · (7 - 7)) = 130 мВ – реакція термодинамічно вигідна

рН = 9 → Δ E₀ = 130 - (30 · (9 - 7)) = 70 мВ – реакція термодинамічно вигідна

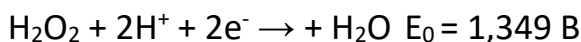
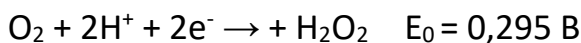
196. При яких рН стане неможливим окиснення цитохрому С нітрат іонами (за умови їх відновлення в нітрит-іони), якщо концентрація окислених і відновлених форм сполук рівні? Оцініть константу рівноваги реакції окиснення цитохрому С убіхіном та намалюйте схематично її залежність від рН.

Складніші завдання

197. Стандартний електродний потенціал реакції відновлення нітрату в нітрит становить 421 мВ, а відновлення нітриту в аміак – 480 мВ. Який він для сумарної реакції і чому не 901 мВ?



198. У дихальному ланцюзі кисень може відновлюватися послідовно:



Розрахуйте зміну вільної енергії Гіббса для кожної з цих двох напівреакцій та на основі неї розрахуйте стандартний електродний потенціал сумарної реакції.

199. Студент вивчав вплив споживання проростків пшениці на біохімічні параметри печінки мишей і встановив, що миші, які їх систематично споживали мали вдвічі більший сумарний вміст глутатіон (GSSG+GSH мкг/г маси печінки), але на 30% менший вміст окисненої форми (GSSG). Чи можна на основі цих даних оцінити наскільки сильно мав би відрізнятися середній окисно-відновний потенціал в клітинах? Чи реалістичні такі зміни на вашу думку?

3. Кінетика

Реакції першого порядку. Двостадійні реакції. Оборотні реакції й константи рівноваги. Реакції другого порядку. Кінетика в складних системах. Термодинамічний та кінетичний контроль процесу. Дифузійною-лімітовані процеси. Основи моделювання кінетики. Каталіз. Кінетика ферментативних процесів. Інгібування. Кінетика у вивченні механізмів реакцій

3.1. Кінетика простих процесів

Пам'ятка:

- Швидкість реакції це швидкість зміни концентрації вихідних реагентів. Вона вимірюється в $M^{-1} \cdot c^{-1} = \text{моль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$
- Реакції типу $A \rightarrow B$, що йдуть без каталізатора найчастіше описуються кінетикою першого порядку (їх швидкість залежить тільки від концентрації речовини А).
 $\text{Rate} = d[A]/dt = k[A]$. Де k - константа швидкості реакції першого порядку, що має розмірність c^{-1} . Зміна концентрації вихідних речовин для реакції першого порядку відбувається за законом $[A] = [A]_0 \cdot e^{-kt}$, де $[A]_0$ – концентрація вихідної речовини в момент часу $t = 0$. Концентрація продукту реакції зростає, відповідно як $[B] = [A]_0 - [A] = [A]_0 \cdot (1 - e^{-kt})$.
- Для оборотних реакцій $A \leftrightarrow B$ встановлюється рівновага положення якої залежить від співвідношення констант швидкостей прямої (k_+) і зворотної (k_-) реакцій.
 В точці рівноваги швидкості прямої і зворотної реакцій рівні
 $k_+[A]_{\text{eq}} = k_-[B]_{\text{eq}}$
 Звідки $k_+/k_- = [B]_{\text{eq}}/[A]_{\text{eq}}$.
 За означенням k_+/k_- рівна константі рівноваги таких реакцій.
- Для реакції другого порядку типу $A + B \rightarrow C$ швидкість залежить від добутку концентрацій вихідних реагентів
 $\text{Rate} = k[A][B]$, де k має розмірність $M^{-1}c^{-1}$
 Якщо концентрація одного з реагентів значно (в десятки разів) вища ніж іншого, вона під час реакції змінюється настільки мало, що може вважатись практично сталою. Тоді реакція описується кінетикою *псевдопершого* порядку.
 $A + B \rightarrow C$
 $[A]_0 \gg [B]_0 \rightarrow [A] \approx [A]_0$
 $\text{Rate} = k[A][B] \approx k[A]_0[B] = k_{\text{app}}[B]$,

Де $k_{\text{app}} = k[A]_0$ – видима (apparent) константа швидкості реакції, що залежить від концентрації реагенту А та має розмірність с^{-1} .

- Залежність кількості продукту від часу в реакції другого порядку $A+A \rightarrow B$
 $[B](t) = [A]_0(1 - 1/(1 + kt[A]_0))$ – тобто період напівреакції зменшується з концентрацією.

- Залежність кількості продукту від часу в реакції другого порядку $A+B \rightarrow C$

$$[C](t) = \frac{[A]_0(1 - \exp(kt([A]_0 - [B]_0)))}{(1 - \frac{[A]_0}{[B]_0} \exp(kt([A]_0 - [B]_0)))}$$

- Може також бути корисна формула $kt = \frac{1}{[A]_0 - [B]_0} \ln \left(\frac{[A][B]_0}{[B][A]_0} \right)$, де $[A]$, $[B]$ – концентрації в момент часу t .

Обов'язковий рівень

Приклад 1:

При 50°C білок А денатурує на 50% за 1 годину. Який відсоток білка зденатурує за 10 хв при цій температурі?

Розв'язок: Термічна денатурація скоріш за все реакція першого порядку.

Стратегія: спочатку рахуємо константу швидкості по відомій часовій точці, а потім на її основі – відсоток перетворення за 10 хв.

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-kt}$$

За умовою

$$t = 3600 \text{ с} \rightarrow [A]/[A]_0 = 0,5$$

але $[A]/[A]_0 = e^{-kt}$, тоді можна розрахувати k

$$k \cdot 3600 \text{ с} = -\ln(0,5) \rightarrow k \approx 1,925 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$$

Це дозволяє розрахувати $[A]/[A]_0$ при $t = 600 \text{ с}$

$$[A]/[A]_0 = \exp(-kt) = \exp(-600 \cdot 1,925 \cdot 10^{-4}) \approx 0,891.$$

Тобто через 10 хв неденаурованим залишиться 89,1% білка, а зденатурує 10,9%.

Приклад 2:

Швидкість гідролізу ліпиду до жирних кислот і гліцеролу в лужному середовищі пропорційна концентрації OH^- . При 10°C реакція за певного вмісту луку відбувається на 10% за годину, а при 20°C – за 20 хв. Оцініть, за скільки часу цей процес відбудеться при 40°C

Розв'язок. Оскільки реакція не ферментативна, то виправдано припустити що її швидкість залежить від температури згідно рівняння Арреніуса: $r = r_0 \cdot \exp(a \cdot T)$. Тобто нагрівання на 10°C збільшує швидкість реакції у фіксовану

кількість раз. Нагрівання суміші від 10 до 20°C збільшило швидкість реакції втричі. Відповідно, нагрівання на 20° (20 → 40°C) призведе до зростання швидкості в $3 \cdot 3 = 9$ раз. Таким чином ми можемо очікувати що при 40°C 10% перетворення займе $20 \text{ хв} / 9 = 2,22 \text{ хв}$ (або 2хв 13с)

200. Швидкість реакції $A + B \rightarrow C$ пропорційна добутку концентрацій A і B. Відомо, що якщо $[A] = 2 \text{ мкМ}$ і $[B] = 10 \text{ мкМ}$, то речовина C утворюється зі швидкістю 100 нМ/с. Чому дорівнює константа швидкості реакції?

201. Як зміниться константа швидкості реакції другого порядку, якщо розчин розвести вдвічі?

202. Напишіть вираз для швидкості реакції димеризації $2A \rightarrow B$. Яка буде розмірність константи швидкості?

203. За ідеальних умов бактерія X30 здатна ділитися кожні 30 хв. Студент вирощував ці бактерії в 2л колбі з метою виділення з них протеїну. О 13:00 за оцінками студента в колбі було близько мільйона бактерій. О котрій годині їх там буде 10 мільйонів?

204. Протеаза X007 взаємодіє з пептидом PEPTYDYK розрізаючи його між треоніном та тирозином. При змішуванні 10 нМ X007 та 1 мМ PEPTYDYK половину пептиду було розрізано за 100 ± 5 хв. Якщо ж взяти 2 мМ PEPTYDYK, то на порізку половини пептиду спотребиться 190 ± 5 хв. Чи можна описати цей процес як реакцію першого порядку і чому?

205. В реакції першого порядку 50% речовини перетворюється за 15 хв. Скільки потрібно часу для 90% перетворення?

206. Швидкість реакції $A + B \rightarrow C$ пропорційна добутку концентрацій A і B. Відомо, що якщо $[A] = 200 \text{ мкМ}$ і $[B] = 10 \text{ мкМ}$, то за 1 хв утвориться 1 мкМ речовини C. Оцініть константу швидкості реакції з точністю $\pm 5\%$.

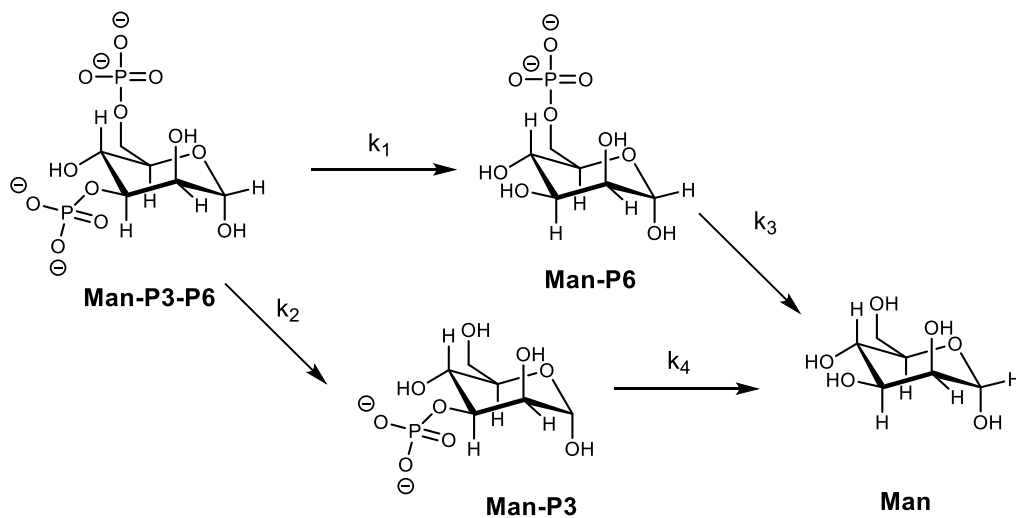
207. Швидкість певної неензиматичної (хімічної) реакції зростає вдвічі при нагріванні на 10°C. Оцініть в скільки приблизно разів зросте швидкість цієї реакції при нагріванні на 30 °C?

Середній рівень

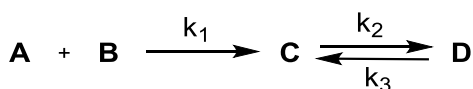
208. Для двостадійної реакції $A \rightarrow B \rightarrow C$ константа швидкості першої стадії становить 7 с^{-1} , а другої $0,07 \text{ с}^{-1}$. Початкова концентрація речовини A становила 10 мМ. Через скільки часу вона знизиться до 5 мМ? Через скільки часу утвориться 5 мМ речовини C?

209. При приготуванні протеїну шляхом експресії в бактеріях спочатку бактеріям дають нарости до певної концентрації, яка відповідає $OD = 0,6$, а потім додають IPTG, речовину, яка індукує експресію потрібного гену. За правильно підібраних умов бактерії діляться приблизно раз в 20-30 хв і їх концентрація, а отже й OD , на початку процесу росту зростає експоненційно. Для покращення виходу потрібного протеїну з літри культури дуже бажано додати індуктор коли OD буде не надто відрізнятись від $0,6$ – десь в діапазоні $0,5-0,8$. Аспірант займається експресією протеїну в великому експерименті (4 2-літрові колби). О 10:45 OD його культури було рівне $0,105$; о 11:15 – $0,255$. О котрій приблизно годині йому потрібно зробити вимір щоб бути максимально близько до оптимального значення $0,6$? (Достатня точність ± 5 хв.)

210. Нехай є реакція гідролізу, яка може йти двома шляхами. (1) Напишіть вираз для залежності концентрації Man-P3-P6 від часу. (2) Напишіть диференціальні рівняння, які описують зміну концентрацій кожної речовини з часом. (рН та концентрація води практично сталі, тому можна вважати, що всі реакції першого порядку).



211. Напишіть диференціальні рівняння, які описують зміну концентрацій кожної речовини з часом. Які розмірності констант швидкості для кожного з процесів?



212. Актинові філаменти здані рости *in vitro* шляхом некаталітичного додаванням мономеру до кінця. Це реакція другого порядку з швидкістю $r = k[E][M]$ де $[E]$ і $[M]$ – концентрації кінців фібрил та мономеру у розчині. Дослідники вивчали залежність швидкості цієї реакції від рН. Щоб оцінити константу швидкості за певних умов вони до $20 \mu\text{M}$ мономерного актину додали фібрили так, що концентрація кінців в утвореному розчині становила

10 нМ і через 45 хв. 10% мономеру перейшло у форму фібрил. Оцініть константу швидкості реакції й порівняйте її з типовими значеннями 1,3 та 11 мкМ⁻¹·с⁻¹ для (+) та (-) кінців, відповідно.

213. Дифосфат X гідролізується в 2 стадії X-P-P → X-P → X. Константа швидкості першої стадії становить 0,001 с⁻¹, а другої 0,1 с⁻¹. Яка приблизно буде концентрація кожної з речовин через 15 хв після початку реакції?

214. Алкогольдегідрогеназа каталізує окислення етилового спирту під дією NAD⁺ з утворенням ацетальдегіду, NADH і протону:
 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$

За проходженням цієї реакції можна спостерігати вимірюючи рН, оскільки в ній утворюється протон. Чи можна її при цьому проводити в буферному розчині (скажімо рН 8,5 TRIS)? Як тоді оцінювати її швидкість?

215. Клітини вигаданої лінії k-lush ендоцитозують 1% своєї мембрани щохвилини вибираючи випадкові ділянки площею близько 500 нм². При цьому всі мембранні протеїни цих ділянок руйнуються. Клітина ж синтезує нові ліпіди й протеїни відновлюючи мембрану. На поверхні однієї з таких клітин міститься 1000 рецепторів X з яких 900 було ушкоджено. Скільки часу спотребиться клітині, щоб відправити на переробку 500 ушкоджених рецепторів? (В реальних клітинах при таких процесах більшість рецепторів не руйнується, а використовуються заново).

216. Амілоїдна фібрила – це одномірний полімер утворений з субодиниць мономерного протеїну. Фібрили ростуть додаванням мономерів до кінця. Нехай константа швидкості зв'язування мономеру до кінця фібрили 1 с⁻¹ мкМ⁻¹, а константа швидкості дисоціації 10 с⁻¹. Розрахуйте константу зв'язування мономеру до фібрили.

217. Неферментативний гідроліз фосфатної групи з фосфорильованого тирозину протеїну DFKp при 10°C й рН = 7 відбувається на 10% за годину, а при 20°C - за 20 хв. Оцініть, за скільки часу цей процес відбудеться при 40°C.

218. Для радіовуглецевого аналізу віку використовують зміну вмісту ізотопу ¹⁴C в зразках дерева чи інших біологічних зразках. В атмосфері та всіх деревах вміст ¹⁴C становить 10⁻¹⁰% від сумарного вмісту карбону. Після зупинки фотосинтезу обмін припиняється й вміст ¹⁴C в деревині починає падати. Період напіврозпаду ¹⁴C становить 5730 років. Вчені знайшли в болоті стовбур дерева в якому вміст ¹⁴C становив (5±2)·10⁻¹²%. Оцініть його вік.

219. Константа дисоціації кисню від молекули оксиміоглобіну становить Kd = [Mb][O₂]/[MbO₂] = 1 мкМ, а константа швидкості для зв'язування O₂ з міоглобіном становить 2 · 10⁷ М⁻¹ с⁻¹. Оцініть константу швидкості дисоціації

комплексу MbO₂ та час за який половина кисню вивільниться з комплексу, якщо він потрапить в середовище, де кисень відсутній.

Приклад 3

Взаємодія $A + B \rightarrow C$ – реакція другого порядку. Початкові концентрації речовин А та В становили 100 мкМ. За годину 60% реагентів перетворилося в продукт С. Оцініть через скільки часу ступінь перетворення становитиме 80%.

Розв'язок: Оскільки початкові концентрації А та В ідентичні, то кінетика цього процесу буде така ж як і в реакції димеризації: $A(t) = A_0/(1+ktA_0)$.

З умови відомо, що

$$[A]_0 = 100 \text{ мкМ}$$

$$\text{при } t = 3600 \text{ с} \rightarrow [A] = 40 \text{ мкМ}$$

це дозволяє порахувати константу швидкості

$$40 = 100/(1+k \cdot 3600 \cdot 100) \rightarrow (1+k \cdot 3600 \cdot 100) = 100/40 \rightarrow$$

$$k \cdot 3600 \cdot 100 = 2,5 - 1 = 1,5 \rightarrow$$

$$k = 1,5/360000 \approx 4,16 \cdot 10^{-6} \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$$

Тепер можна підставити в формулу константу швидкості й $[A] = 20$ мкМ та отримати час від початку реакції.

$$20 = 100/(1+4,16 \cdot 10^{-6} \cdot t \cdot 100) \rightarrow$$

$$1+4,16 \cdot 10^{-6} \cdot t \cdot 100 = 100/20 = 5$$

$$4,16 \cdot 10^{-6} \cdot t \cdot 100 = 4$$

$$t = 9600 \text{ с}$$

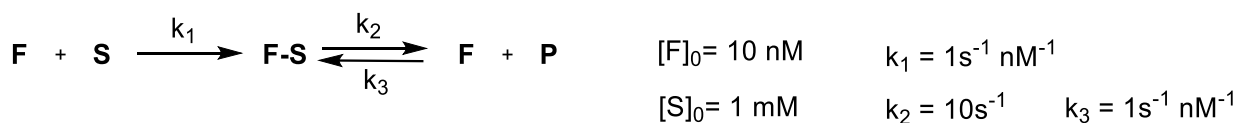
Тобто ще 6000 с (1 год 40 хв) з моменту досягнення 60% перетворення.

Таке різке сповільнення на пізніх стадіях реакцій другого порядку спонукає використовувати надлишок одного з реагентів щоб уникнути сповільнення.

220. Приєднання малеїміду до цистеїну – реакція другого порядку. Мічення 100 мкМ моноцистеїнового мутанту протеїну ХХК в присутності 180 мкМ Atto-488-maleimid за годину пройшло на 80%. Скільки ще потрібно почекати для досягнення 90% перетворення? (достатня точність ± 30 хв)

Складніші завдання

221. Оцініть, скільки продукту Р утвориться протягом 60 секунд в такій системі.



222. Протеїни Х та Y оборотно зв'язуються утворюючи комплекс 1:1.



Кінетика взаємодії описується рівнянням

$$d[\text{complex}]/dt = k_+[X][Y] - k_-\text{[complex]}$$

1 нМ розчину протеїну X міченого проданом (флуоресцентним барвником чутливим до оточення) змішали з а) 10 нМ протеїну Y, б) з 50 нМ протеїну Y, в) з 100 нМ протеїну Y, г) з 200 нМ протеїну Y. Після цього вимірювали залежність інтенсивності емісії продану від часу, частину даних наведено в таблиці. Оцініть константу дисоціації комплексу на X та Y з точністю $\pm 20\%$. Вважайте, що за даних умов реакція добре описується кінетикою $k_{app} \sim ([Y] - K_d)$

Час, мс	0	10	20	30	40	60	80	120	160	220	300	400	500
Сигнал 10 нМ	5,010	5,010	5,003	5,007	5,012	5,014	5,014	5,015	5,022	5,032	5,037	5,047	5,053
Сигнал 50 нМ	5,038	5,294	5,531	5,753	5,930	6,216	6,409	6,699	6,851	6,957	7,008	7,006	7,013
Сигнал 100 нМ	5,007	5,689	6,130	6,438	6,630	6,824	6,954	7,027	7,025	7,018	7,043	7,011	7,000
Сигнал 200 нМ	5,033	6,222	6,679	6,914	6,980	7,007	7,038	7,020	7,015	7,004	7,031	7,022	7,033

223. 7,6 нМ розчину протеїну X міченого проданом змішали з а) 76 нМ протеїну Y, б) з 152 нМ протеїну Y, в) з 450 нМ протеїну Y. Залежність інтенсивності емісії від часу наведена в таблиці. Вважайте, що це реакція другого порядку, яка йде до кінця і оцініть константу швидкості.

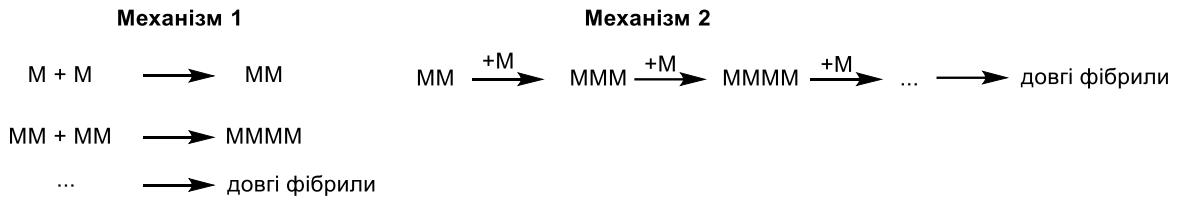
Час, мс	10	20	30	40	60	80	120	160	220	300	400	600	900
Сигнал 76 нМ	1,191	1,285	1,446	1,545	1,686	1,933	2,353	2,693	3,207	3,791	4,345	5,272	6,092
Сигнал 152 нМ	1,332	1,493	1,752	1,911	2,341	2,732	3,306	3,880	4,552	5,279	5,794	6,541	6,935
Сигнал 450 нМ	1,704	2,373	2,871	3,313	4,142	4,766	5,653	6,180	6,636	6,869	6,954	7,044	7,080

224. 10 нМ розчину протеїну X міченого сольватохромною флуоресцентною міткою змішали з а) 100 нМ протеїну Y, б) з 500 нМ протеїну Y. Залежність інтенсивності емісії від часу наведено в таблиці. Вважайте, що це реакція другого порядку, яка йде до кінця (необоротна) і оцініть константу швидкості.

Час, с	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
Експ. а	1,10	1,73	2,29	2,91	3,36	3,87	4,33	4,87	5,21	5,60	5,99	6,37	6,70	6,99
Експ. б	1,06	5,99	8,73	10,22	11,03	11,54	11,71	11,84	12,00	11,99	11,98	12,05	12,06	12,04

225. Цитозольний розчинний протеїн X здатен за певних умов переходити в амілоїдні фібрили – ланцюжки з багатьох молекул протеїну в β -конформації зв'язані міжмолекулярними водневими зв'язками. Довгий час механізм такого процесу залишався невідомим. Вважалося, що протеїн може або (1) спочатку утворювати димери, які потім збираються в тетрамери і вищі олігомери або (2) фібрили можуть поступово рости додаванням мономерів до їх кінців. Суперечка легко вирішилась, коли був поставлений доволі простий *in vitro*

експеримент, в якому якісно виміряли кінетику утворення фібрил на останніх стадіях агрегації 50 мкМ протеїну у розчині. В таблиці наведено дані з двох незалежних експериментів. На який з двох запропонованих механізмів вказують результати?



Час, хв	200	220	240	260	280	300	320	340	360
Частка фібрилізованого протеїну, %	87,54	89,89	91,78	93,34	94,59	95,60	96,43	97,11	97,65
Частка фібрилізованого протеїну, %	84,11	86,78	89,00	90,85	92,39	93,67	94,73	95,62	96,36

3.2. Кінетика каталітичних процесів

Обов'язковий рівень

226. У лабораторії досліджували реакцію розкладу субстрату S ферментом E. Для цього вимірювали кінетику реакції при різних початкових концентраціях субстрату, залишаючи концентрацію ферменту сталою. Початкова швидкість реакції за різних концентрацій субстрату наведено в таблиці. Припустіть, що реакція каталізується ферментом за механізмом Михаеліса-Ментен. Визначте значення параметрів V_{\max} та K_m .

[S] ₀ , мМ	0	0,5	1,0	2,0	4,0
V ₀ , мкМ/с	0	0,011	0,02	0,033	0,041

227. Каталаза – фермент, що каталізує розклад пероксиду водню на воду і кисень. Студенти вивчали залежність його активності від температури. В кварцову кювету для фотометрії з буфером вони внесли 10 мМ пероксид та 1 нМ каталазу. Вимірювання поглинання при 240 нм показало, що за 20 секунд концентрація пероксиду знизилася на 1 мМ (розраховано з використанням коефіцієнта молярного поглинання). Студенти вирішили, що реакція надто швидка щоб точно поміряти константу швидкості і взяли в наступному експерименті вдвічі меншу концентрацію пероксиду, 5 мМ. Проте, вони знову отримали спадання на 1 мМ за приблизно 20 с. Чим може бути обумовлений такий результат? Чи дозволяють дані експерименту оцінити k_{cat} та k_{cat}/K_m ферменту?

Середній рівень

228. Фермент глюкозооксидаза, який виробляється деякими видами грибів та комах, каталізує окиснення β -D-глюкози до глюконолактону з утворенням пероксиду водню. Ця реакція може бути застосована для визначення вмісту глюкози оскільки пероксид водню, що утворюється в її процесі, може окислювати о-фенілендіамін, ABTS чи інші хромогенні реагенти в присутності пероксидази утворюючи забарвлені продукти. На лабораторній роботі студенти вивчали активність глюкозооксидази саме таким способом. Спочатку вони взяли 1 нМ глюкозооксидазу, 5 мМ глюкозу та надлишок ABTS і пероксидази. Поглинання при 420 нм зростало лінійно, і за перші 30 с воно відповідало утворенню 1 мМ глюкози. У другому експерименті студенти використали 1 мМ глюкозу й швидкість реакції зменшилась – поглинання, що відповідало утворенню 1 мМ глюкози, виникло приблизно через 2 хв. Що можна сказати на основі цих даних про k_{cat} та k_{cat}/K_m глюкозооксидази?

229. Реакція $A \rightarrow B$ каталізується ензимом E. В початковий момент часу концентрація речовини A становила 1 мМ, а ензиму – 100 нМ. За ходом реакції спостерігали по зміні поглинання світла ($\epsilon(A) = 6000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) з часом. Розрахуйте видиму константу швидкості реакції розглядаючи її як псевдопершого порядку.

t, c	480	560	640	720	800	880	1000	1200	1500
OD	1,936	1,396	0,8092	0,2125	0,145	0,1045	0,1063	0,1018	0,1009

Складніші завдання

230. Реакція $A \rightarrow B$ каталізується ензимом E. В початковий момент часу концентрація речовини A становила 1 мМ, а ензиму – 100 нМ. За ходом реакції спостерігали по зміні поглинання світла ($\epsilon(A) = 6000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; $\epsilon(B) = \epsilon(E) = 0 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) з часом. Розрахуйте а) видиму константу швидкості реакції вважаючи її реакцією псевдопершого порядку ($r = k_{\text{app}}[A]$), б) константу швидкості реакції другого порядку ($r = k[A][E]$).

t, c	660	760	860	960	1060	1160	1260	1360	1460	660	760	860
OD	2,04	1,44	0,788	0,125	0,05	0,005	0,007	0,002	0,001	2,04	1,44	0,788

231. Реакція $A \rightarrow B$ каталізується ензимом E. В початковий момент часу концентрація речовини A становила 1 мМ. За ходом реакції спостерігали по зміні поглинання світла ($\epsilon(A) = 6000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; $\epsilon(B) = \epsilon(E) = 0 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) за період 15 хв при різній концентрації ензиму. Розрахуйте константу швидкості реакції другого порядку ($r = k[A][E]$).

E, нМ	0	10	20	40	80	90	100	120	140	160	180	200	
OD		2,301	2,301	2,299	2,299	1,681	1,14	0,6	0	0,001	0	0,001	0,002

232. Вигаданий протеїн SHAP здатен самостійно згортатися в нативну форму після теплової денатурації з $k = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Разом з тим, за присутності АТФ він здатен також каталізувати згортання інших молекул SHAP так, що швидкість каталітичного процесу становить $0,1 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. 100 мкМ розчин SHAP денатурували. Намалюйте схематично графік ренатурації (залежність концентрації нативної форми SHAP від часу) за відсутності АТФ та в його присутності.

3.3. Кінетика й інгібування

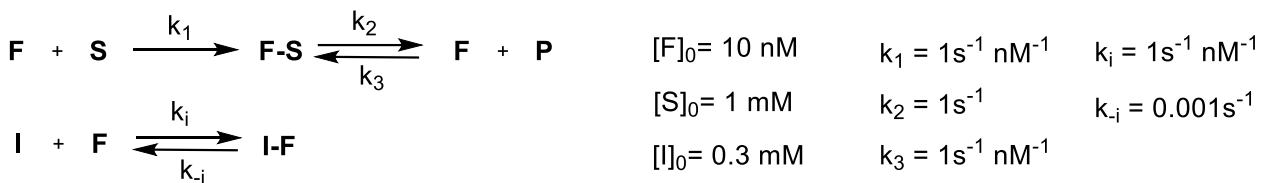
Середній рівень

233. Дослідники вивчали систему де фермент F каталізує утворення продукту P з субстрату S, а пептид I здатен швидко й оборотно зв'язуватися з S в неактивний комплекс I-S. В експерименті вони використовували $[F] = 5 \text{ нМ}$, $[S]_0 = 100 \text{ мкМ}$ і отримали для пептиду I значення $IC_{50} = 5 \text{ мкМ}$. Поясніть, що викликає підозру в достовірності такого висновку.



234. Димерний фермент F каталізує перетворення S в P. На своїй поверхні він має два сайти зв'язування для інгібітора I ($K_d = 700 \text{ нМ}$ для кожного). Зв'язування інгібітора до одного з сайтів знижує швидкість утворення комплексу фермент-субстрат на 10%, а до обох – на 95%. Намалюйте схематично залежність швидкості утворення продукту від концентрації інгібітора і покажіть як ви використали наведені в умові числа для побудови цієї залежності.

235. Оцініть, скільки продукту P утвориться протягом 60 секунд в такій системі й на скільки ця величина знизилась через наявність інгібітора.



Складніші завдання

236. 10 нМ розчину протеїну X міченого проданом змішали з а) 100 нМ протеїну Y, б) з 200 нМ протеїну Y, в) з 400 нМ протеїну Y. г) з 600 нМ протеїну Y, д) з 900 нМ протеїну Y. В усіх випадках в розчині присутня певна концентрація протеїну Z який зв'язується з протеїном Y з $K_d < 0,01 \text{ нМ}$. Залежність інтенсивності емісії від часу дана в таблиці. Оцініть концентрацію інгібітора Z з точністю $\pm 20\%$. (Вважайте, що комплекс Z-Y не взаємодіє з X, а також що швидкість реакції X і Y пропорційна добутку їх концентрацій). Чи можна на основі цих даних вважати, що протеїн Z є інгібітором взаємодії X+Y

Час, с	0	100	200	300	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000
Сигнал 100 нМ	3,001	3,011	3,011	3,011	3,006	3,013	3,017	3,011	3,019	3,015	3,025	3,019	3,026
Сигнал 200 нМ	3,005	3,153	3,298	3,442	3,572	3,839	4,089	4,331	4,559	4,773	4,986	5,176	5,365
Сигнал 400 нМ	3,004	3,711	4,332	4,878	5,367	6,172	6,798	7,283	7,664	7,960	8,190	8,377	8,515
Сигнал 600 нМ	3,006	4,214	5,182	5,948	6,563	7,450	8,013	8,373	8,604	8,743	8,842	8,900	8,938
Сигнал 900 нМ	3,009	4,882	6,171	7,060	7,671	8,376	8,704	8,868	8,935	8,975	8,992	9,000	9,007

3.4. Моделювання процесів

Обов'язковий рівень

Приклад 1

Змодельуйте перебіг двостадійної реакції $A \rightarrow B \rightarrow C$ при різних співвідношеннях констант швидкостей першої (k_1) та другої (k_2) стадій, якщо в початковий момент часу в системі присутня тільки сполука А.

Розв'язок:

Спершу записуємо кінетичні рівняння всіх процесів та вирази для їх швидкостей:



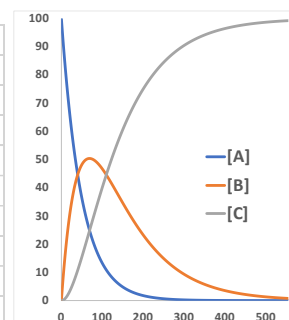
Тоді на основі цих рівнянь записуємо на скільки змінюється концентрація кожної речовини з часом. Для речовини А концентрація зменшується з швидкістю $r = k_1 \cdot [A]$ тобто $d[A]/dt = -k_1 \cdot [A]$

Речовина В, фігурує в системі двічі: вона утворюється в першому процесі з швидкістю $k_1 \cdot [A]$ та витрачається в другому з швидкістю $k_2 \cdot [B]$. Зміна її концентрації, відповідно, це різниця цих швидкостей $d[B]/dt = k_1 \cdot [A] - k_2 \cdot [B]$

На кінець, речовина С утворюється з тією ж швидкістю, з якою витрачається В: $d[C]/dt = k_2 \cdot [B]$

Подальший розв'язок залежить від того, яке середовище вам зручніше використовувати для моделювання. Якщо робити це в Excel, то можна використати 7 колонок: першу для часу, далі три колонки для поточних концентрацій речовин А,В,С та три колонки для поточних швидкостей зміни кожної з них (значення в яких розраховуються по формулах, наведених вище. Значення ж концентрацій в кожному наступному рядку задати як поточні концентрації + швидкість зміни для певної речовини

		k1=	0.02			
		k2=	0.01			
t	[A]	[B]	[C]	d[A]/dt	d[B]/dt	d[C]/dt
1	100	0	0	-2	2	0
2	98	2	0	-1.96	1.94	0.02
3	96.04	3.94	0.02	-1.9208	1.8814	0.0394
4	94.1192	5.8214	0.0594	-1.88238	1.82417	0.058214
5	92.23682	7.64557	0.117614	-1.84474	1.768281	0.076456

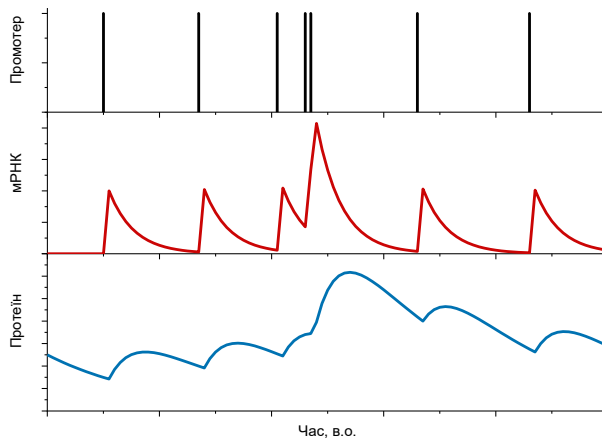


Або та сама сторінка якщо відобразити формули

		k1=	0.02			
		k2=	0.01			
t	[A]	[B]	[C]	d[A]/dt	d[B]/dt	d[C]/dt
1	100	0	0	=-\$E\$1*C6	=\$E\$1*C6-\$E\$2*D6	=\$E\$2*D6
=B6+1	=C6+F6	=D6+G6	=E6+H6	=-\$E\$1*C7	=\$E\$1*C7-\$E\$2*D7	=\$E\$2*D7
=B7+1	=C7+F7	=D7+G7	=E7+H7	=-\$E\$1*C8	=\$E\$1*C8-\$E\$2*D8	=\$E\$2*D8

237. Змодельуйте поведінку реакції першого порядку ($A \rightarrow B$) та другого ($2A \rightarrow B$) й порівняйте їх. Якщо в обох системах 50% перетворення досягається одночасно, то в якій з них швидше досягнеться 90% перетворення?

238. Нижче зображено схему, яка пояснює чому коливання концентрації протеїну в клітині мають меншу амплітуду, ніж коливання відповідної мРНК. Підготуйте аналогічний графік скориставшись реалістичними швидкостями деградації протеїну та мРНК.



4. Структура та властивості біологічних молекул

Ковалентні, водневі, іонні зв'язки. Біополімери та індивідуальні молекули. Дифузія та розмір молекул. Первинна, вторинна, третинна структура протеїнів. Дисульфідні зв'язки. Взаємозв'язок між амінокислотою послідовністю та вторинною структурою.

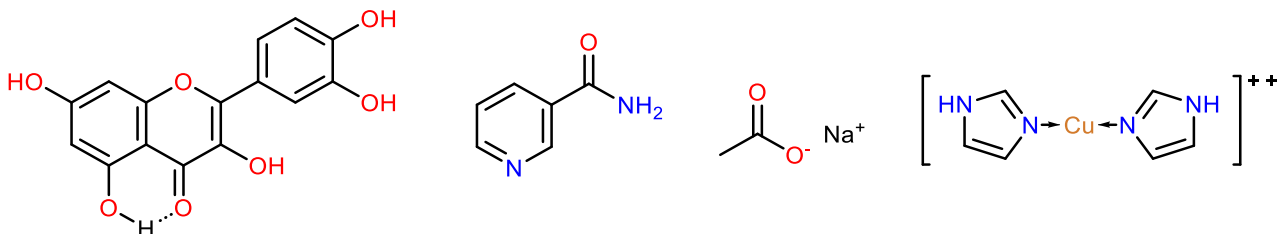
4.1. Зв'язки та взаємодії

Пам'ятка

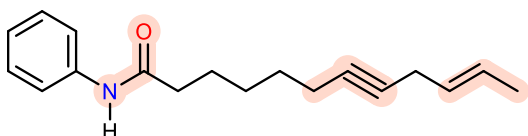
- Енергії більшості водневих зв'язків біологічних молекул 6-30 кДж/моль. Більш кислотні групи, зазвичай є кращими донорами водневих зв'язків, а більш основні – акцепторами. Неподілені пари електронів біля sp^2 гібридизованих N та O є дуже хорошими акцепторами водневих зв'язків.
- Внутрішньомолекулярні водневі зв'язки найміцніші коли утворюються 5- та 6-членні цикли.
- Енергія гідрофобних взаємодій пропорційна площі контакту гідрофобних поверхонь.
- Збільшення іонної сили розчину послаблює електростатичні взаємодії та посилює гідрофобні.

Обов'язковий рівень

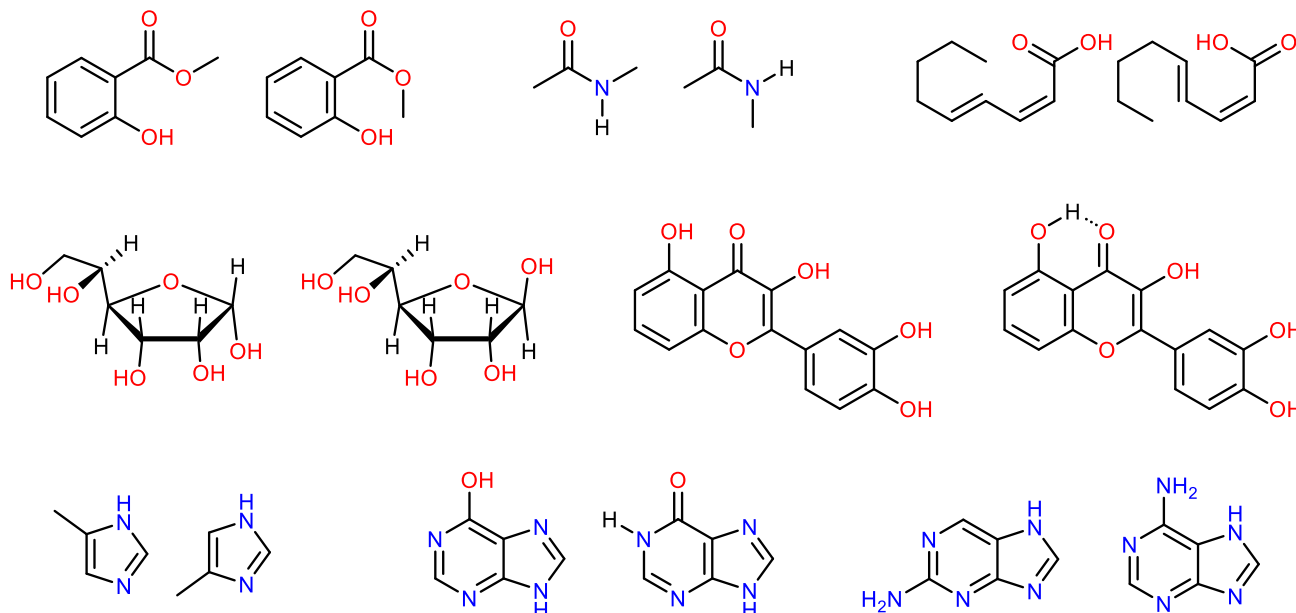
239. Які типи зв'язків (ковалентні, іонні, водневі,...) наявні в кожній з цих сполук/? Чи є серед наведених чотирьох структур такі, які не можна вважати молекулами?



240. Які кути між кожною виділеною трійкою атомів у цій молекулі?

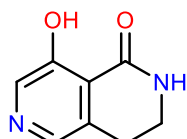


241. В кожній з пар сполук скажіть чи зображено однакові молекули чи різні? Вважайте, що якщо при розчиненні молекул у воді при кімнатній температурі утворюється однаковий розчин, то їх можна вважати ідентичними в контексті цієї задачі.

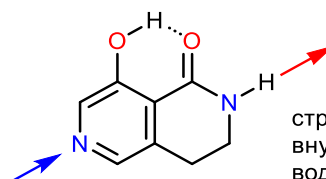
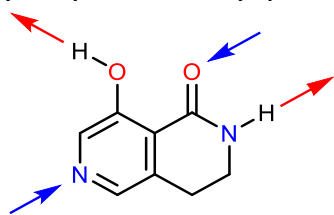


Приклад 1

Визначте, де в цій молекулі донори й акцептори водневих зв'язків. Поставте стрілочки від донорів та стрілочки до акцепторів. Чи може в ній утворюватися внутрішньомолекулярний водневий зв'язок?

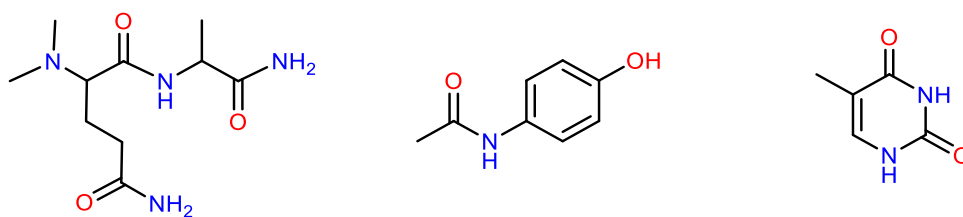


Розв'язок: Нітроген в циклі здатен протонуватися – він буде сильним акцептором водневих зв'язків. Фенольний гідроксил достатньо кислотний – від нього буде сильним донором водневих зв'язків. Другим по силі акцептором водневих зв'язків буде амідна карбоксильна група, а донором – амідний NH протон, по аналогії з карбонільною та NH групами поліпептидних ланцюгів. Ця молекула містить донор та акцептор та акцептор на сусідніх групах та може утворювати внутрішньомолекулярний водневий зв'язок.

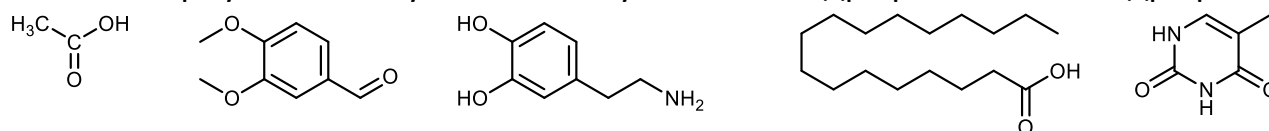


структура з
внутрішньомолекулярним
водневим зв'язком

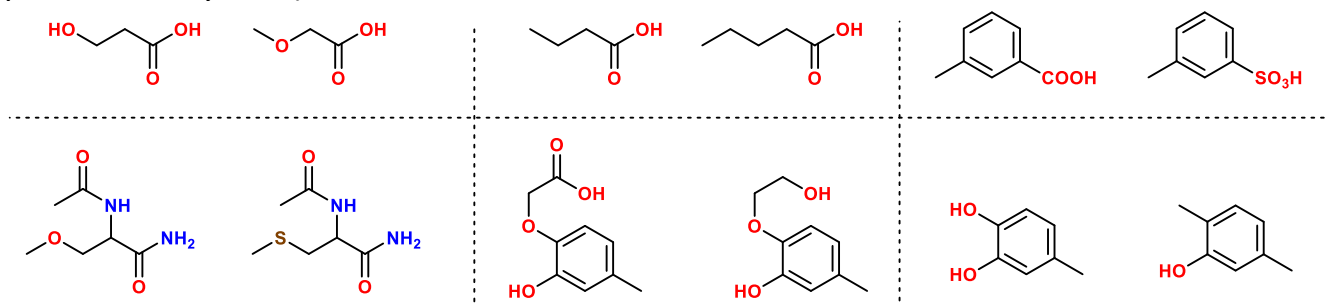
242. Визначте, де в цих молекулах донори й акцептори водневих зв'язків. Поставте стрілочки від донорів та стрілочки до акцепторів.



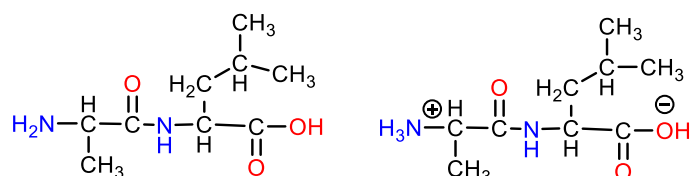
243. Класифікуйте наступні молекули як гідрофільні та гідрофобні.



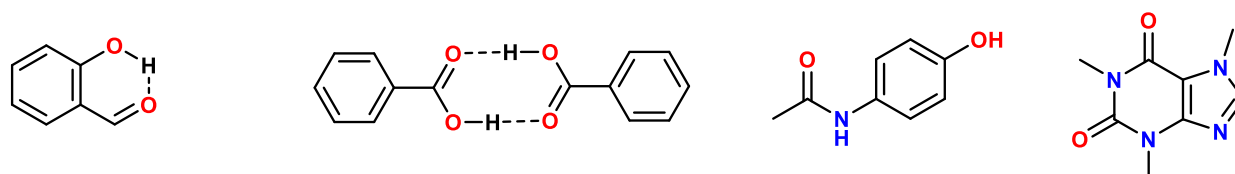
244. В кожній з пар молекул визначте яка більш гідрофільна (має кращу розчинність у воді).



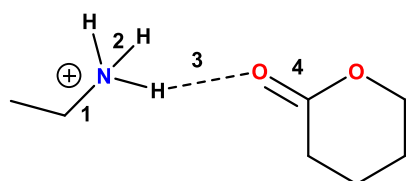
245. Яка з цих форм дипептиду більш стабільна в воді при кімнатній температурі й чому?



246. Які з цих молекул (1) утворюють внутрішньомолекулярні водневі зв'язки, (2) утворюють міжмолекулярні з такою ж молекулою?



247. Розмістіть ці зв'язки в порядку спадання міцності.

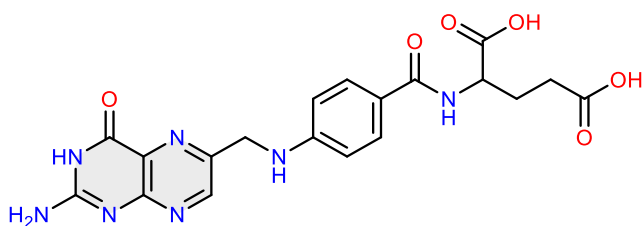


248. В скільки приблизно разів міцність одного С—С зв'язку вища за міцність водневого зв'язку в пептидах?

249. Які параметри є ключовими, щоб кількісно оцінити енергію гідрофобної взаємодії між двома протеїнами?

Середній рівень

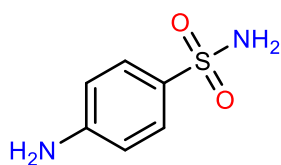
250. Нижче наведено структуру фолієвої кислоти. Придумайте молекулу, з якою виділене кільце утворюватиме 3 міцних водневих зв'язки та наведіть приклад їх комплексу.



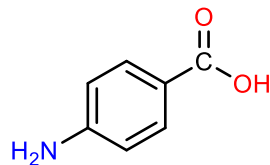
251. Який тип взаємодії ви очікували б побачити між бічними ланцюгами в кожній з таких пар амінокислот: 1) триптофан і тирозин, 2) треонін та аспартамід, 3) аспарагінова кислота та лізин?

252. Константа дисоціації комплексу протеїну з ДНК в 10 мМ TRIS рН = 7,4 становить 5,3 мкМ, а в 10 мМ фосфатному буфері (рН = 7,4), 150 мМ NaCl – 28 мкМ. Ця взаємодія обумовлена переважно електростатичними чи гідрофобними силами?

253. Сульфаніламід зупиняє ріст бактерій за рахунок того, що зв'язується з ферментом, який перетворює пара-амінобензойну кислоту на фолієву кислоту, та інгібує його. Фолієва кислота необхідна для синтезу нуклеїнових кислот. На відміну від бактерій, організм людини не здатен її синтезувати й отримує з їжі. Тому вплив сульфаніlamіду на людину набагато менший. Вкажіть в кожній з молекул донори та акцептори водневих зв'язків й запропонуйте гіпотезу як саме сульфаніламід може зв'язуватися з активним сайтом ферменту.

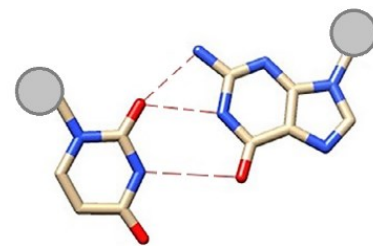


сульфаніламід



п-амінобензойна кислота

254. На схемі зображено "неправильну" пару основ – U-G, але пропущено атоми Гідрогену. Намалюйте цю ж взаємодію за допомогою формул правильно зобразивши водневі зв'язки.



255. Володимир та Оксана вивчали взаємодію невеликого катіонного пептиду з ДНК. Володимир проводив всі експерименти у 10 мМ фосфатному буфері рН = 7,4 й дійшов висновку, що пептид зв'язується з $K_d = 780 \pm 200$ нМ та стехіометрією 8 нуклеотидів на пептид. Оксана ж працювала з PBS (такий самий фосфатний буфер, але з додаванням 150 мМ хлориду натрію) і її експерименти показали $K_d = 8 \pm 2$ мкМ та дещо вищу стехіометрію (9 ± 1 нуклеотид на молекулу пептиду). Чим могла б бути обумовлена така різниця? Хто зі студентів більш вірно підійшов до експерименту, якщо пептид розглядався як потенційний засіб для покращення трансфекції?

4.2. Амінокислоти та пептиди

Пам'ятка

- Відносна схильність амінокислот входити в певні типи структур протеїнів, їх гідрофобність та рКа

Аміно-кислота	Гідрофобність	рКа бічного ланцюга	α -спіраль	β -шар	згин	Ціна в АТФ	
E	Glu	-3,5	4.3	1.59	0.52	1.01	20
A	Ala	1,8		1.41	0.72	0.82	16
L	Leu	3,8		1.34	1.22	0.57	44
M	Met	1,9		1.3	1.14	0.52	25
Q	Gln	-3,5		1.27	0.98	0.84	21
K	Lys	-3,9	10.4	1.23	0.69	1.07	36
R	Arg	-4,5	12,3	1.21	0.84	0.9	31
H	His	-3,2	6.5	1.05	0.8	0.81	32
V	Val	4,2		0.98	1.87	0.41	31
I	Ile	4,5		1.09	1.67	0.47	39
Y	Tyr	-1,3*	9.8	0.74	1.45	0.76	57
C	Cys	2,5	8.6	0.66	1.4	0.54	17
W	Trp	-0,9*		1.02	1.35	0.65	71
F	Phe	2,8		1.16	1.33	0.59	62
T	Thr	-0,7		0.76	1.17	0.9	20
G	Gly	-0,4		0.43	0.58	1.77	12
N	Asn	-3,5		0.76	0.48	1.34	16
P	Pro	-1,6**		0.34	0.31	1.32	26
D	Asp	-3,5	3.9	0.99	0.39	1.24	14
S	Ser	-0,8		0.57	0.96	1.22	14

*Тирозин та триптофан в пептидах більш гідрофобні (сильніше зменшують розчинність), ніж тут вказано, через π -стекинг. **Пролін як залишок більш гідрофобний, але його введення руйнує внутрішньомолекулярні водневі зв'язки збільшуючи гідрофільність ділянок протеїнів
Дані взято з Kyte, J. and Doolittle, R.F., *J. Mol. Biol.* 157, 110 (1982), Williams et al., *BBA*, 916(2), 1987, 200–204

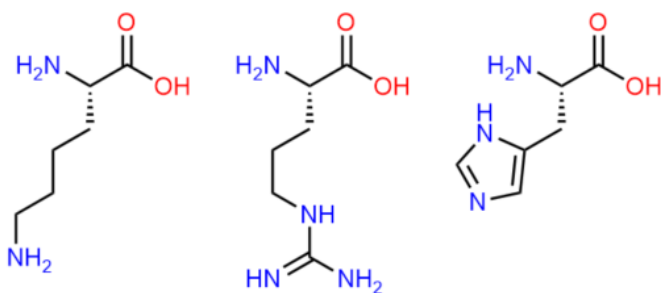
Обов'язковий рівень

256. Напишіть три амінокислоти, які найчастіше фосфорилюються при посттрансляційних модифікаціях протеїнів.

257. Один студент записав трипептид Val-Ala-Arg без дефісів, а інший подумав, що це однобуквенна нотація послідовності пептиду з 9 амінокислот. Напишіть цей 9-амінокислотний пептид в трибуквеній нотації.

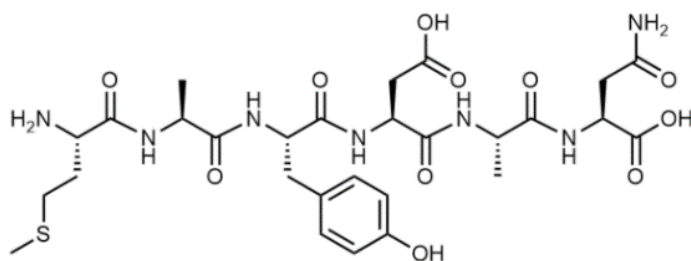
258. В чому головна відмінність проліну від інших 19 класичних амінокислот що входять до складу протеїнів?

259. Нижче наведено структури лізину, аргініну та гістидину. Намалюйте структури, які переважатимуть в розчині цих кислот при $\text{pH}=3, 7, 11$.

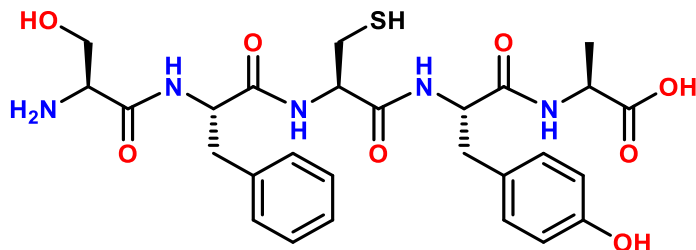


260. В чому принципова відмінність залежності заряду амінокислот від pH коли вони у вільній формі та у формі пептидів?

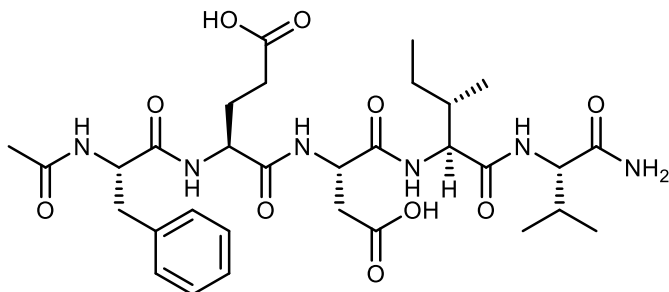
261. Напишіть послідовність цього пептиду



262. Напишіть послідовність цього пептиду в однобуквеній нотації



263. Напишіть послідовність цього пептиду в трибуквеній нотації, зверніть увагу на С та N-кінці.



264. Порахувати молекулярну масу пептиду ITALY.

265. Чи буде водорозчинним пептид LATVIA?

- 266.** В кожній з груп амінокислот оберіть найбільш гідрофільну (введення якої в пептид буде призводитиме до більшої розчинності у воді): (a) Ala, Ile, Met; (b) Ser, Ala, Thr; (c) Trp, His, Phe.
- 267.** В кислому чи лужному середовищі буде вища розчинність пептиду FRANKIVSK?
- 268.** Який з пептидів у списку зайвий: KYIV, MINSK, WARSHAWA, BERLIN, PARIS, AMSTERDAM, FRANKIVSK?
- 269.** У вас є такі пептиди: NADVIRNA, PEREGINSK, HALYCH, KARPATY. Які з них не містять ароматичних амінокислот?
- 270.** Які з цих пептидів будуть мати ізоелектричну точку вище 8: ADENI, KVITKA, ATARN?
- 271.** рKa імідазольного ядра гістидину становить приблизно 6,1. Оцініть, який відсоток гістидину буде протоновано в неструктурованому протеїні при рН = 7 та при рН = 7,4.
- 272.** Активний центр ферменту містить глутамінову кислоту, яка має протонувати субстрат під час реакції. Проте, це можливо тільки, якщо вона сама перебуває в нейтральній (-COOH), а не іонізованій (-COO⁻) формі. Який відсоток ферменту міститиме нейтральну глутамінову кислоту при рН = 6,4 та при рН = 7? рKa карбоксильної групи глутамінової кислоти становить приблизно 4,1.
- 273.** Які з цих амінокислот мають бічні групи, що здатні утворювати водневі зв'язки: P, Q, R, T, F, A, N, K, I, V, S?
- 274.** Бічні групи яких амінокислот можуть найбільш сильно взаємодіяти з бічною групою лізину при рН = 7?
- 275.** Наведіть приклад водорозчинного (рН = 7) 15аа пептиду.
- 276.** Яку найменшу та найбільшу молекулярну масу може мати пептид довжиною 10 амінокислот?
- 277.** Наведіть приклад 10аа пептиду що не в змозі утворювати α -спіраль і при рН 7 має заряд $\geq +3$
- 278.** В деяких протеїнах можуть виникати іонні зв'язки між бічними ланцюгами аргініну та аспарагінової кислоти. Намалюйте їх структуру.

Приклад 1

Оцініть заряд пептиду VARENYK при рН = 7,4

Розв'язок: Шукаємо в послідовності, амінокислоти, які можуть нести заряд – R, E, Y, K, N-кінець, C-кінець. Оцінюємо заряд кожної з них при рН = 7,4:

R (+1), E(-1), Y (0), K(+1), N-кінець(+1), C-кінець(-1) – сумарно +1.

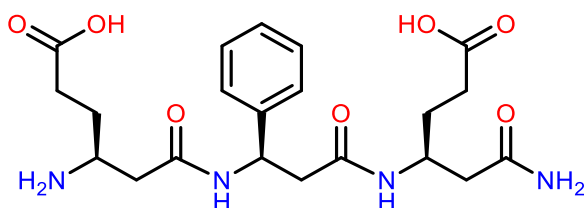
Можна вважати що якщо pK_a відрізняється від pH більше, ніж на 2 одиниці, то кислота повністю протонувана/депротонувана. При різниці на 1 одиницю ступінь дисоціації становить 90%.

Середній рівень

279. Який з таких пептидів буде найбільш і найменш водорозчинний і чому **KFIFAFIFAK**, **FIKFAFIKFA**, **FIFAFIFAKK**?

280. Амінокислота гліцин, хоч і не має функціональних груп критичних для взаємодії часто буває генетично (еволюційно) стабільна в протеїнах. Пояснить, в чому може бути причина.

281. Даний трипептид не може бути фрагментом ні α -спіралі ні антипаралельного β -складчастого шару. Що не звичного в цьому трипептиді?



282. Чому концентрацію пептиду **WARSHAWA** можна поміряти набагато легше й точніше ніж пептиду **AMSTERDAM** ?

283. Скільки може існувати різних трипептидів?

284. Основним компонентом бджолої отрути є 26-амінокислотний пептид мелітин. **GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ**. Підкресліть в його структурі заряджені амінокислоти та намалюйте схематично залежність середнього заряду амінокислоти від позиції.

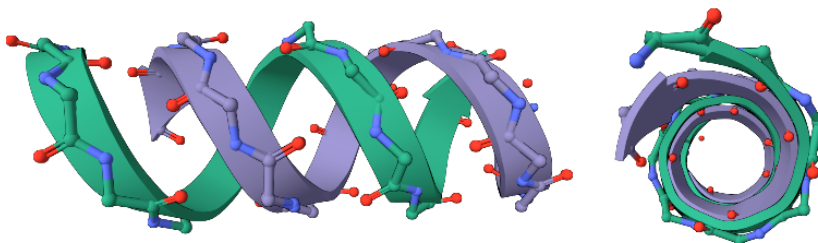
285. Антимікробний пептид цекропін **A** має послідовність. **KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVAVVGQATQIAK**. Який заряд його молекули при $pH = 7$? Який середній заряд на одну амінокислоту? Який вміст ліпофільних та β -розгалужених амінокислот у %? Який механізм його дії можна запропонувати на основі цих даних?

286. Ця діаграма показує вторинні структури відомих антимікробних пептидів, зокрема вміст β -складчастого шару та α -спіралей (див.



en.wikipedia.org/wiki/Antimicrobial_peptides). Чому на ній наявна така велика "заборонена зона"? Чи варто займатись пошуком синтетичних антимікробних пептидів, які відповідали б їй? Якщо так, то які амінокислоти варто було б спробувати ввести в їх склад в першу чергу?

287. Що заважає більшості природних пептидів та фрагментів протеїнів утворювати подвійну спіраль типу такої, як зображено на рисунку?



(PDB: 3L8L, бокові ланцюги не показані)? Яка особливість будови синтетичного пептиду могла б дозволити утворювати схожий димер навіть якщо б він не містив гліцинів?

288. Студент вирішив згенерувати випадкову послідовність протеїну взявши шматок тексту з англomовного з підручника і видаливши в ньому всі літери, які не відповідають однобуквеним кодам амінокислот: "THESHRTTESTCNNCTINSTHATAREPSSILEETWEENTHESTRANDSDEPENDNTHENAT REFTHESHEETINANTIPARALLELSHEETSTHESECNNCTINSCANEASSHRTASTWRES IDEASAREVERSETRN". Які амінокислоти в послідовностях згенерованих таким способом зустрічаються набагато частіше ніж в реальних протеїнах людини? Чи можете ви сказати, що було написано в оригінальному шматку тексту?

289. Оцініть ізoeлектричну точку для дипептидів DE, ST та KL.

290. Фосфорилування є важливим регуляторним механізмом, який відіграє ключову роль у діяльності багатьох ферментів, мембранних каналів та інших білків. Намалюйте структуру 3 амінокислот, які найчастіше фосфорилуються.

291. Міростилування – посттрансляційна модифікація, яка зустрічається в близько 1% еукаріотичних протеїнів та полягає в ацилюванні N-кінця нерозгалуженою жирною кислотою C14. Намалюйте структуру міростильованого метіоніну на N-кінці протеїну.

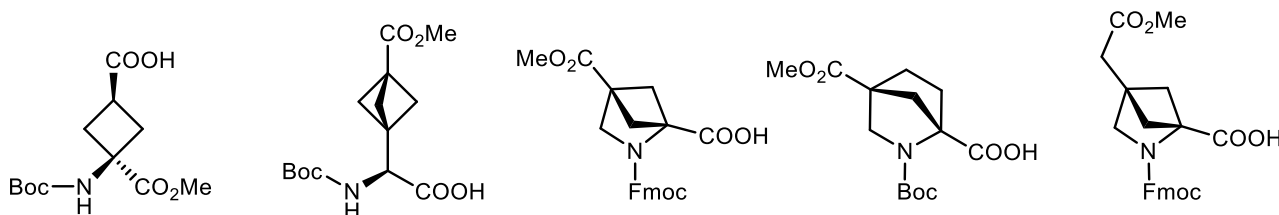
Складніші завдання

292. Скільки різних тетрапептидів може утворитися при гідролізі пептиду KARPATSKABILKA?

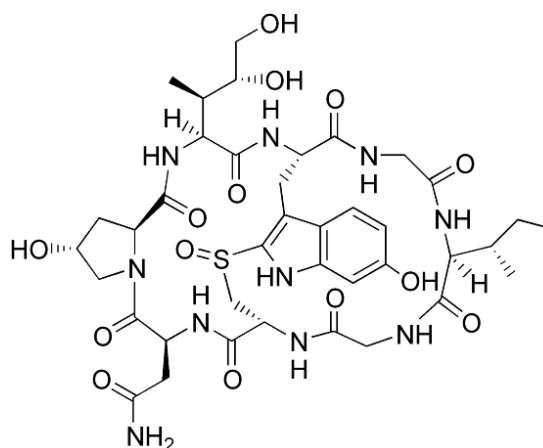
293. За рахунок дисульфідних зв'язків пептид SRACHTLKDCRGHTRCHAFG може перебувати в різних формах. Наведіть будь-які 4 з них.

294. Метилування лізину є найбільш частою посттрансляційною модифікацією гістонових протеїнів. Намалуйте структуру Nε-метиллізину та скажіть, які його взаємодії можуть стати сильнішим чи слабшими порівняно зі звичайним лізином.

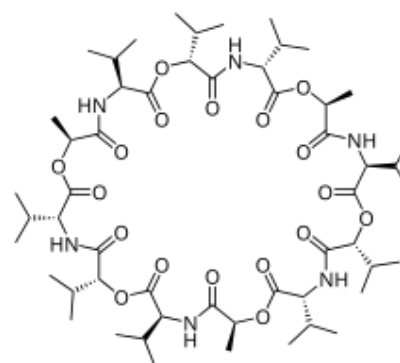
295. Українська компанія Єнамін, яка виробляє реагенти для розробки лікарських препаратів продає такі похідні ненатуральний амінокислот, де Fmoc та Boc – тимчасовий захист аміногрупи для полегшення синтезу. Як ви гадаєте, для чого може слугувати введення таких амінокислот в пептиди, які є лікарськими препаратами?



296. Циклічний пептид α -аманітин, що містяться в мухоморах та блідих поганках, є селективним інгібітором РНК-полімерази II (<https://doi.org/10.2210/pdb1K83/pdb>) і, відповідно, сильним токсином. На відміну від багатьох інших циклічних пептидів, він синтезується за участю рибосом. Напишіть, які класичні та модифіковані амінокислоти присутні в ньому.



297. Валіноміцин – природний додекадепсипептид, який полегшує транспортування іонів калію через мембрани й інколи використовується як антибіотик. Поясніть за рахунок чого в нього є селективність в зв'язуванні йонів калію й натрію. Які кислоти присутні в його структурі?



4.3. Просторова будова протеїнів

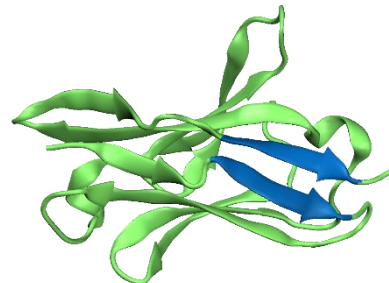
Пам'ятка

- На 1 виток α -спіралі припадає 3,6 амінокислот (5 витків на 18 амінокислот). Крок кожного витка становить 0,54 нм.
- β -складчастий шар має середню довжину 0,34 нм на залишок.

Обов'язковий рівень

298. В чому різниця між протеїном, що містить два домени та протеїном, який є гомодимером в нативній формі?

299. Як називається вторинна структура в фрагменті виділеному синім кольором?



300. Мутація A53T в білку α -синуклеїн збільшує його схильність до утворення амілоїдних фібрил та ризик раннього розвитку хвороби Паркінсона. Чим це може бути обумовлено?

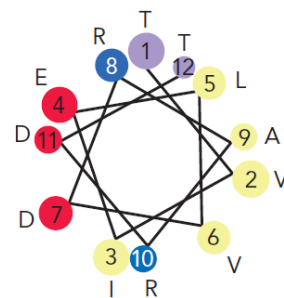
301. Вигаданий цитозольний протеїн має молекулярну масу 15 024 Да та заряд +5 при pH = 7. Оцініть як вплине на ці два параметри мутація L53K.

302. Протеїн містить два фрагменти: KLKLLKAT та SGPPKVA. Який з них з більшою ймовірністю буде утворювати α -спіраль при зв'язуванні з мембраною і чому?

303. Скористайтесь схемою розміщення амінокислот в α -спіралі та сконструйте 25-амінокислотний домен протеїну, що буде зв'язуватися з мембраною й лежати на її поверхні частково зануреним.

304. Пептид MRVKEKYQHLWRWGWRWG схильний утворювати α -спіраль. Вкажіть з якими амінокислотами утворює водневі зв'язки його тирозин.

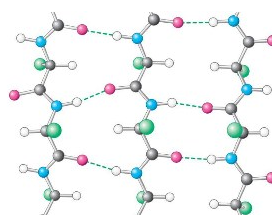
305. Напишіть амінокислотну послідовність фрагменту протеїну, якому відповідає така діаграма розміщення амінокислот в α -спіралі. Намалюйте як на вашу думку такий фрагмент би орієнтувався при взаємодії з мембраною.



306. Пептид GGRGGGPGPGEGG має внутрішньомолекулярний іонний зв'язок. Намалюйте його схематично.

307. Напишіть принаймні 4 типи нековалентних взаємодій, які стабілізують третинну та четвертинну структуру протеїнів.

308. Який тип вторинної структури зображено на рисунку?



309. Гістони – дуже основні протеїни з ізоелектричною точкою pI \approx 10,8. Які амінокислоти це можуть забезпечувати?

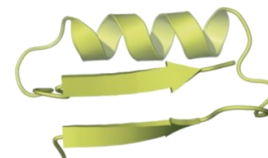
310. Чому не буває α -спіральних фрагментів довжиною менше 6 амінокислот?

Середній рівень

311. Поясніть, чому трансмембранні β -діжки протеїнів практично завжди мають парну кількість β -шарів.

312. Намалюйте розміщення амінокислот на сторонах α -спіралі (скориставшись колом) для пептиду Ac -WKKLLKLLKLLKL-CONH₂.

313. Ось структура $\beta\alpha\beta$ елемента. Оцініть приблизно скільки в ній амінокислот. Вважайте, що в β -складчастому шарі одній амінокислоті відповідає приблизно 0,34 нм.



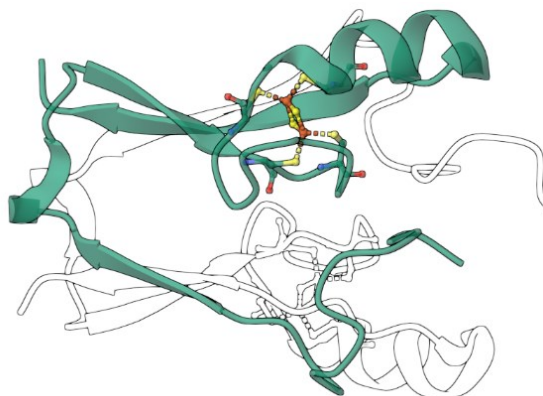
314. Чому в активних центрах гідролаз найчастіше зустрічається гістидин, а в оксиредуктаз – цистеїн?

315. Протеїн тропоміозин, який часто асоційований з актиновими філаментами, має молекулярну масу біля 70 кДа і складається з двох переплетених α -спіралей (PDB: 1C1G). Оцініть його довжину в нанометрах.

316. Уявіть що ви приготували протеїн, який має таку ж довжину поліпептидного ланцюга як і гемоглобін та побудований з тих самих амінокислот, але вони розміщені у випадковому порядку. Яку розчинність ви б очікували для такого протеїну?

317. Нижче зображено структуру димерного протеїну, що містить кластер Fe₂S₂ (PDB: 3S2R). Знайдіть в послідовності наведеного фрагменту 4 залишки, що зв'язуються з атомами Fe.

GSHMRKQQRMVVRAEGGGGINPEIRKNED
KVVDSVVTELSKNITPYCRCWRSRGTFFPLC
DGSCVKHNKANGDNVGPLLLKKQ.



318. Якщо зварити яйце, то білок стає твердим і не розчиняється у воді. Проте, його можна розчинити в воді з пральним порошком за наявності β -меркаптоетанолу як відновника. Що при цьому відбувається? (в деяких сучасних пральних порошках можна розчинити й без додавання відновника, бо вони часто містять ензими що деградують протеїни).

Складніші завдання

319. Поясніть, чому пролін майже ніколи не зустрічається в коротких трансмембранних α -спіралях, проте інколи зустрічається в довгих (≥ 22 залишків).

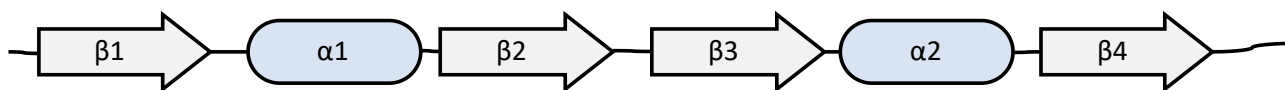
320. Чому в пептиді KAP \underline{Q} KLAKLATK пролін не заважає утворенню α -спіралі, а в пептиді KAAQKLAKL \underline{P} TK – заважає?

321. Незважаючи на те, що гліцин не має функціонального бічного ланцюга він часто є консервативною амінокислотою в структурі протеїнів. В чому може бути причина?

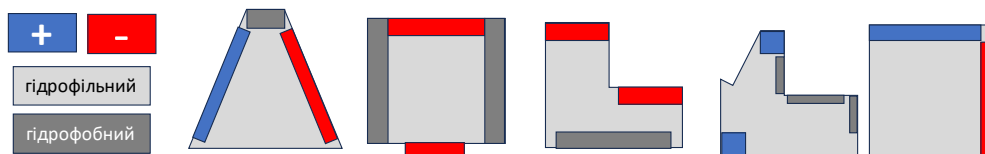
322. Чому ділянки 3_{10} спіралі довжиною 3-4 амінокислоти часто зустрічаються на кінцях α -спіралей глобулярних протеїнів?

323. До розчину пептидів RTLTL \underline{L} KLQLLT \underline{K} KK та RTIT \underline{I} IKIQIIT \underline{K} KK у буфері з pH = 6,5 потроху додають аполярний розчинник ацетонітрил. Який з пептидів першим почне переходити в α -спіральну конформацію? (пептиди різняться тільки тим що у одному з них лейцини, а в іншому – ізoleyцини)

324. Згідно з даними ЯМР-спектроскопії (хімзсуви $C\alpha$) амінокислоти протеїну перебувають в таких конформаціях (лінія може відповідати як згину так і неструктурованому фрагменту). Запропонуйте спосіб яким цей протеїн може згортатися у глобулу (намалюйте ескіз) та вкажіть, які взаємодії забезпечують стабільність запропонованого вами укладання.



325. Як на вашу думку можуть організуватися в димери чи олігомери протеїни, структуру яких схематично зображено нижче. Кольором показано заряд чи гідрофільність відповідних частин протеїну. Взаємодіями поза площиною малюнка знехтуйте.

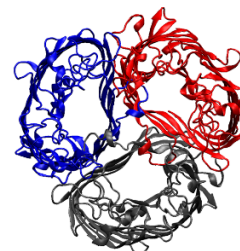


326. Антимікробний пептид з яду скорпіонів, панденін-2 має послідовність FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD. Що ви можете сказати про його взаємодію з мембраною на основі послідовності?

327. Підкресліть амінокислоти, з якими утворює водневі зв'язки лейцин, коли фрагмент протеїну TAQA \underline{K} GAL \underline{L} KAPKFS перебуває в α -спіральній конформації.

328. Який максимальний відсоток амінокислот в конформації β -складчастого шару ви могли б очікувати для 200-амінокислотного мономерного глобулярного протеїну.

329. Цукрозо-специфічний порин збирається на мембрані в тример такої топології. (PDB: 1A0S). Завдяки чому може досягатися те, що протеїн набуває саме тримерної форми і не утворює димерів чи вищих олігомерів?



Література до розділу

- Dagmar Klostermeier, Markus G. Rudolph; **Biophysical Chemistry** ISBN 9781482252248 (e-book) / **розділ 16**
- Amit Kessel, Nir Ben-Tal; **Introduction to Proteins Structure, Function, and Motion** ISBN 978-1-4987-4717-2 / **вся книга**

4.4. Структура ДНК і РНК

Обов'язковий рівень

330. Скільки атомів фосфору в молекулі tRNA_{Lys} (приблизно, $\pm 10\%$)?

331. В чому принципова різниця між олігонуклеотидами GAGATA і GAGAUUA?

332. Чому суперспіральна структура частіше зустрічається в циклічних ДНК ніж в одониткових РНК?

333. В чому принципові відмінності між водневими зв'язками, які стабілізують спіраль ДНК та α -спіраль протеїнів?

334. Чому молекула ДНК у воді завжди асоційована з великою кількістю катіонів, переважно Mg²⁺?

335. Чи може олігонуклеотид TATATATACGCCCCATATATATATATA утворювати стабільну шпильку і якщо так, то яку?

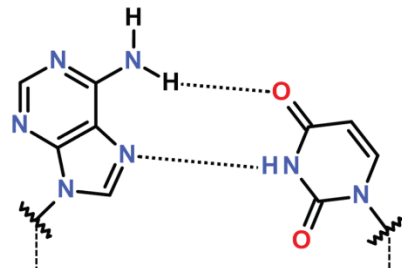
336. Чи може олігонуклеотид TATATATACGCCCCATCTACTACTA утворювати стабільну шпильку і якщо так, то яку?

337. Оцініть довжину (в нм) двониткової ДНК молекулярною масою 100 кДа.

338. Відомо, що певний самокомплементарний олігонуклеотид на 90% перебуває у формі димеру у буфері, який містить 10 мМ NaCl і 1 мМ MgCl₂. Як вплине додавання більшої кількості кожної з цих солей на рівновагу між димером та мономером?

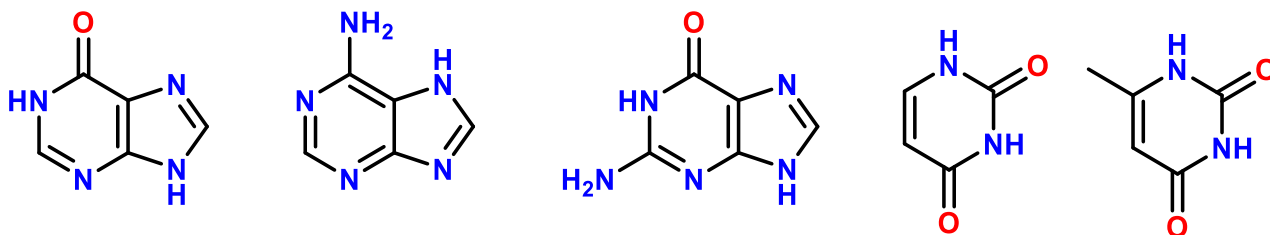
339. Скористайтесь таблицею кодонів і напишіть: (1) Яка послідовність з 6 нуклеотидів відповідає парі амінокислот триптофан-метіонін? (2) Скільки різних послідовностей з 6 нуклеотидів кодують пару амінокислот валін-аланін?

340. Що зображено на малюнку? Чому така пара дуже рідкісна в живих організмах?



341. Чому кількість різних тРНК в клітині менша за кількість різних кодонів амінокислот?

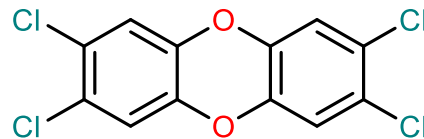
342. Які з наведених основ зустрічаються в ДНК? Як вони називаються? Які основи їм комплементарні?



343. Які нуклеотиди найчастіше входять до складу квадруплексів?

344. Напишіть послідовність РНК комплементарну до АТАТСГСГА.

345. Тетрахлордіоксин – сильна отрута, що здатна міцно інтеркалювати в ДНК викликаючи порушення. Його смертельна доза для людини становить приблизно 0,03 мг/кг. Оцініть приблизне масове співвідношення між ним і ДНК в організмі за такої концентрації.



Середній рівень

346. Наведіть приклад самокомплементарного олігонуклеотиду з 10 основ, що містить фрагмент ТАСА.

347. Наведіть приклад олігонуклеотиду з 25 основ, що перебуватиме у формі шпильки.

348. Основний вклад в стабільність подвійної спіралі ДНК роблять не водневі зв'язки між парами основ. Чому так і які взаємодії є більш важливими для стабільності?

349. Що означає такий запис в підручнику: BstEII G↓GTNACC; BstXI CCANNNNN↓NTGG ?

350. В одному з підручників написано, що "шпильки РНК з тетра nukлеотидними петлями UNCG, GNRA та CUUG є особливо стабільними ("particularly stable UNCG,

GNRA, and CUUG tetraloops"). Поясніть, що мають на увазі коли кажуть про РНК з послідовністю GNRA.

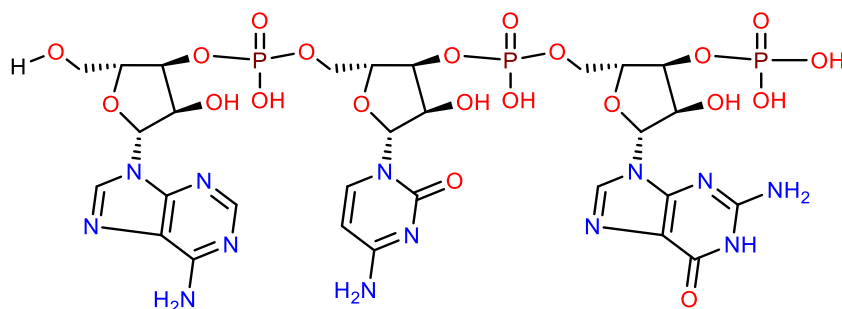
351. Уявіть, що в гені протеїну відбулась однонуклеотидна заміна в кодоні, який кодує валін. Скориставшись таблицею кодонів амінокислот визначте можливі варіанти заміни амінокислоти та оцініть, які з цих мутацій найбільше змінять просторову структуру або стабільність цього протеїну?

352. Якщо олігонуклеотид TGTGTGTGTGTACACACAC розчинити у воді (рН ~7, 25°C), то він буде переважно перебувати не в мономерній формі. Схематично зобразіть його найбільш стабільну вторинну структуру (наприклад, шпильку або дуплекс) та оцініть середню кількість нуклеотидів, що братимуть участь у комплементарному паруванні.

353. З кодонів яких амінокислот можна отримати кодон триптофану шляхом однонуклеотидної мутації?

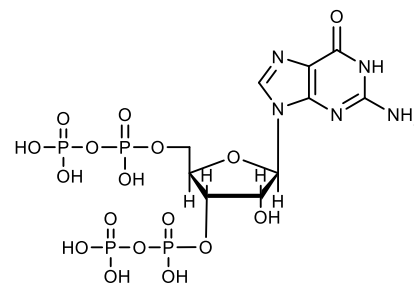
354. Аспірант зробив ПЛР-ампліфікацію, але не отримав бажаного продукту. Спочатку він перевіряв чи працюють реагенти й пристрій в іншому експерименті й переконавшись, що з ними все гаразд вирішив перевірити дизайн праймера, CGGCGGCATATGCCGCCGCC. Що в такій структурі праймера могло вплинути на проходження ПЛР?

355. Що це за молекула? а) Запишіть її структуру компактно. б) Які атоми будуть депротоновані при рН = 7?



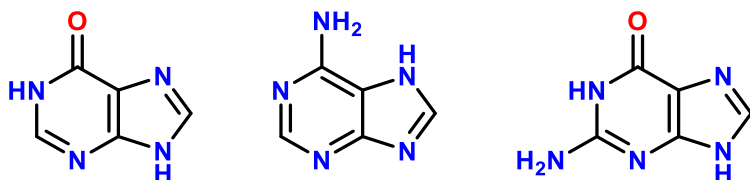
температурі буде плавитися дуплекс ПНК-ДНК порівняно зі стандартним ДНК-ДНК тієї ж послідовності нуклеотидів та чому?

362. Гуанозин тетрафосфат (ppGpp) є так званим "алармоном" – вторинним месенджером в бактеріях, що інгібує синтез рибосомальної РНК коли є нестача амінокислот в клітині. Який на вашу думку типовий заряд цієї молекули? За рахунок яких взаємодій він може селективно розпізнаватися протеїнами, які не повинні реагувати на АТФ та GTP?

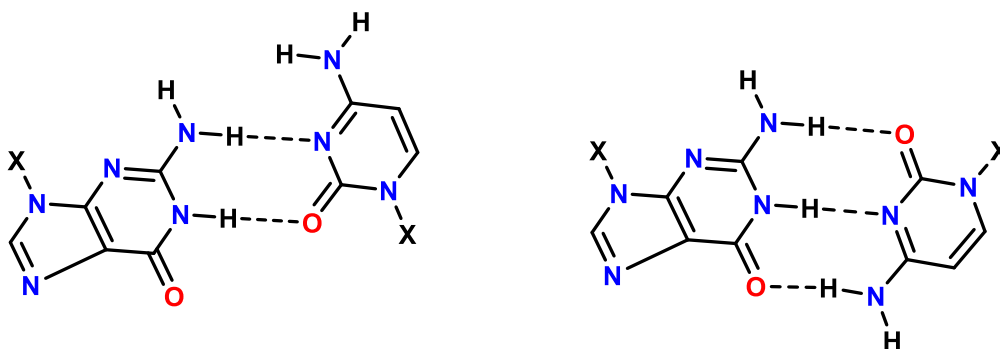


Складніші завдання

363. Ці три основи зустрічаються в антикодоновій ділянці тРНК. Які основи комплементарні кожній з них?



364. На малюнку зображені пари основ. Яка з них частіше зустрічається в нестандартних ділянках РНК з паралельною спіраллю ніж в антипаралельній спіралі ДНК і чому?

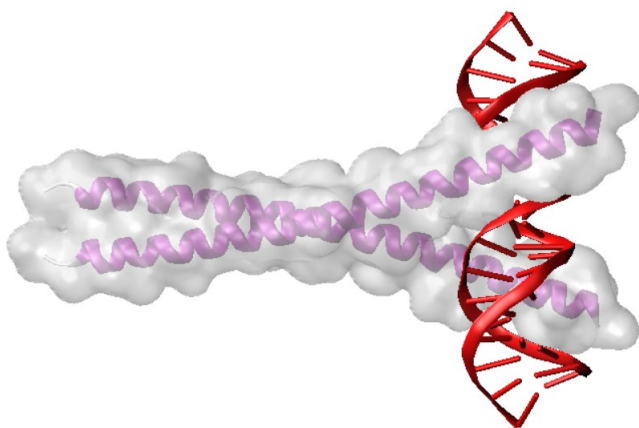


365. Віроїди – невеликі циклічні молекули РНК, які інфікують рослини потрапляючи в їх клітини через механічне пошкодження, реплікуються клітинними ферментами і переходять в інші рослини діючи як мінімізована версія вірусу з одної лиш РНК. Нижче наведено приклад віроїда, що вражає листки винограду [doi:10.1371/journal.pone.0007686]. 1) Оцініть, який відсоток нуклеотидів в його структурі знаходиться у формі подвійної спіралі. 2) Які елементи вторинної структури зустрічаються в його молекулі і скільки разів? 3) Практично всі віроїди мають паличкоподібну форму, хоч і є циклічними РНК.

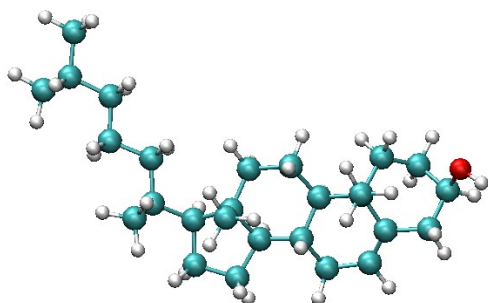
4.5. Візуалізація й аналіз структур біомолекул

Увага. Для відповідей на всі завдання цього розділу потрібно наводити не тільки зображення, а й текстовий підпис, який пояснює, що саме зображено, що виділено, на основі яких файлів PDB зроблено візуалізацію

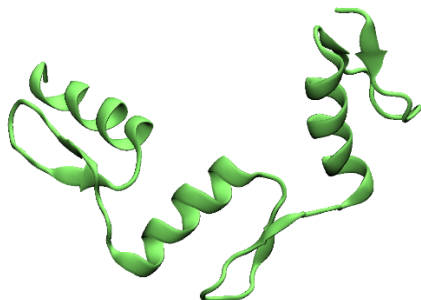
367. bZIP протеїни розпізнають ДНК зв'язуванням α -спіралі до великої боріздки. Зробіть візуалізацію такої взаємодії в стилі наведеному нижче.



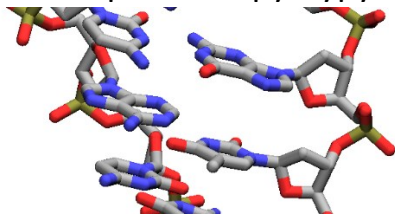
368. Зробіть ілюстрацію структури аденіну в стилі, в якому зроблено ілюстрацію структури холестеролу нижче.



369. Зобразіть структуру будь-якого протеїну в такому стилі (налаштування VMD New Cartoon, розфарбування якимось одним кольором).



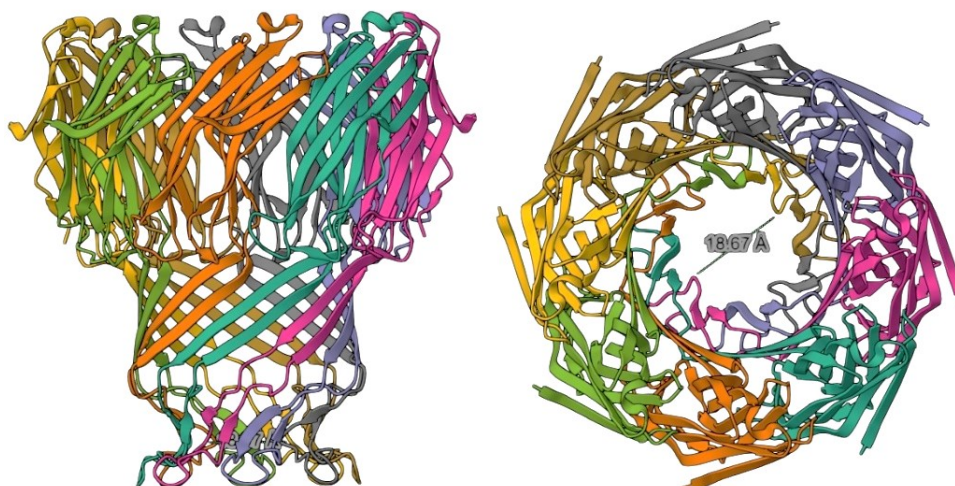
370. Зобразіть структуру будь-якого фрагменту ДНК чи РНК в такому стилі



371. Зобразіть структуру протеази OmpT (outer membrane protease) *E. coli*. та вкажіть її розміри.

372. Пептид мелітин, набуває α -спіральної конформації, хоч і містить пролін в середину своєї послідовності (PDB:6DST). Зобразіть його структуру й покажіть як наявність проліну впливає на геометрію спіралі.

373. Порин *Mycobacterium smegmatis* є олігомерним протеїном. Скільки в ньому мономерних субодиниць? Який діаметр пори? Скористайтесь онлайн-інструментом <https://www.rcsb.org/3d-view/1UUN> та підготуйте зображення схоже, до наведеного нижче.



Середній рівень

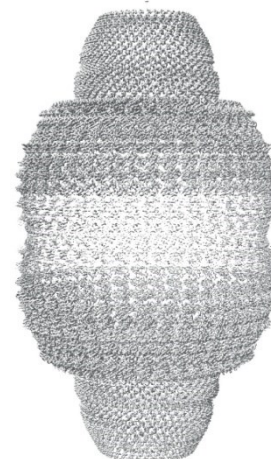
374. Зробіть ілюстрацію, яка показує димерний, тримерний та тетрамерний протеїни виділивши мономерні субодиниці кольором.

375. Зобразіть структуру будь-якого глобулярного протеїну з молекулярною масою 25-150 кДа та покажіть на ній розміщення пролінів.

Складніші завдання

376. Зобразіть 5 будь-яких трансмембранних α -спіральних протеїнів та вкажіть як вони розміщені по відношенню до мембрани. Покажіть на кожному з них катіонні амінокислоти на поверхні мембрани з внутрішньої та зовнішньої сторони клітини. Що ви можете сказати про співвідношення їх кількостей?

377. Органела звід (англ. vault) має розмір близько 40×40×70 нм і є одним з найбільших макромолекулярних комплексів. Вона складається з двох чашок утворених десятками копій кількох протеїнів, всередині яких міститься коротка РНК та протеїн, що асоціюється з теломеразами. Ця органела присутня практично у всіх еукаріотичних клітинах, але її функції наразі не зрозумілі. Проаналізуйте будову комплексу (pdb 9R86) та напишіть скільки копій кожного з протеїнів наявні в ньому. Зробіть ілюстрацію, аналогічну наведеній тут, але виділіть одну копію кожної з субодиниць червоним кольором.



378. Інколи ДНК може перебувати у вигляді потрійної спіралі. Зобразіть її структуру на основі даних з PDB: 1BWG. Зобразіть один з триплетів основ які утворюють водневі зв'язки вказавши між якими атомами вони спостерігаються.

379. Зробіть ілюстрацію, що показує ключові відмінності структури А-, В- та Z-ДНК.

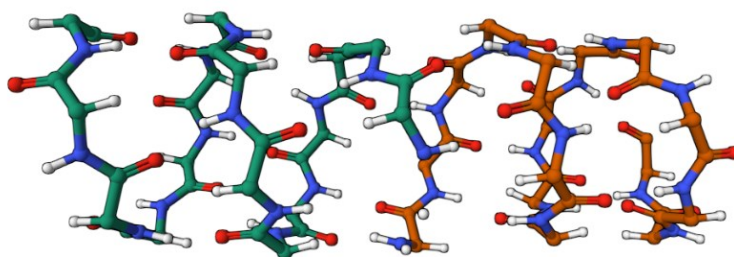
380. Підготуйте ілюстрацію, яка показує як НТН (Helix-turn-helix) мотив відповідає за зв'язування ДНК.

381. Проаналізуйте структури 10 будь-яких α -спіральных мембранних протеїнів, щоб визначити середню довжину трансмембранної α -спіралі та середню кількість таких спіралей на протеїн.

382. Зробіть ілюстрацію, яка пояснює різницю між $\alpha+\beta$ та α/β мотивами в структурі протеїну.

383. Зобразіть структуру комплексу I (<https://www.rcsb.org/structure/5LDW>) й покажіть розміщення в ньому кластерів Fe-S та шлях передачі електронів

384. Нижче зображено структуру граміцидину в мембрані DMPC отриману на основі даних твердофазного ЯМР (PDB: 1MAG). Підготуйте ілюстрацію, яка пояснює відмінності такої конформації від класичної α -спіралі, зокрема вкажіть крок спіралі, внутрішній діаметр, скільки амінокислот приходить на один оберт. Чим на вашу думку може бути обумовлено те, що граміцидин утворює таку структуру, а не більш звичну α -спіраль?



5. Ліпіди й мембрани

Гідрофобні та гідрофільні сполуки. Детергенти. Ліпосоми. Проникність крізь мембрану. Осмотичний тиск.

5.1. Гідрофобність та гідрофільність

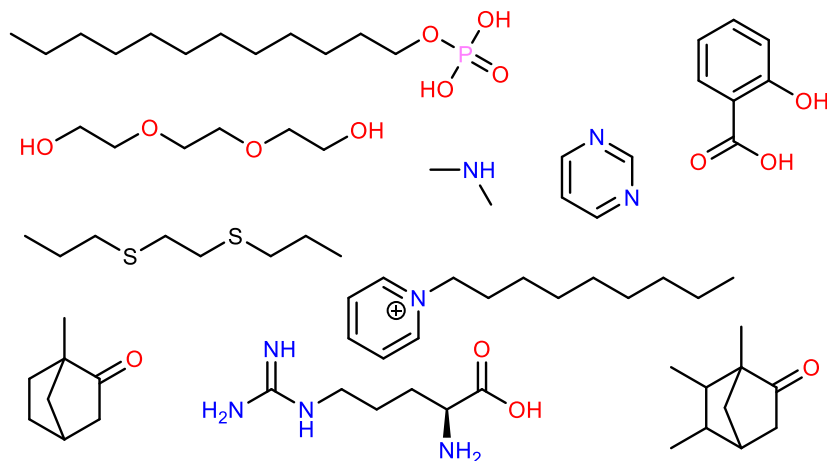
Пам'ятка:

- Гідрофільність молекули – схильність до змішування з водою. Гідрофобність – відсутність такої схильності. Більшість гідрофобних молекул є ліпофільними – схильними до розчинення в жирах та аполярних розчинниках. Проте, це не завжди вірно, скажімо ртуть не розчинна ні у воді, ні у жирах.
- Гідрофільність чи гідрофобність речовини визначається відносним вмістом груп здатних взаємодіяти з водою.
- Найбільше збільшують гідрофільність молекул заряджені групи $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{NMe}_3^+$.
- Практично всі полярні групи збільшують гідрофільність. Особливо це стосується груп, здатних утворювати міцні водневі зв'язки: $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, карбонільна група, sp^2 гібридизований Нітроген (“піридиновий”). Досить гідрофільною є і етерна група.
- Типовими гідрофобними групами є довгі аліфатичні ланцюги ($\dots-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), фенільні кільця, та поліциклічна ароматика, диалкілсульфіди.
- Для швидкої оцінки водорозчинності молекул можна використовувати емпіричне правило: Молекули, в яких третина неводневих атомів полярні – переважно водорозчинні, а в яких менше – переважно ні. Скажімо етанол $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{OH}$ – має один Оксиген і два Карбони – третина атомів полярні, водорозчинний. Бутанол $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ має один полярний атом з п'яти – малорозчинний у воді.

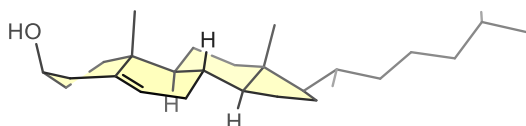
Обов'язковий рівень

385. Наведіть приклади аніонного, катіонного, незарядженого та цвіттеріонного детергентів.

386. Які з цих сполук гідрофільні, гідрофобні, а які мають властивості детергентів?

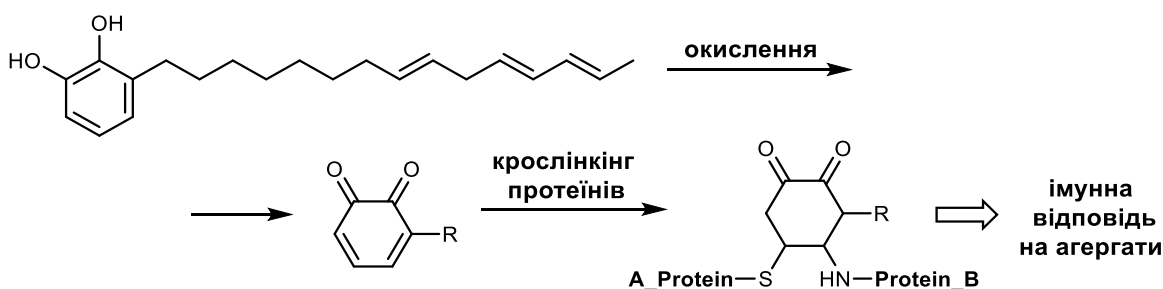


387. На рисунку зображена приблизна тривимірна структура холестеролу. Як він буде орієнтуватися в клітинній мембрані?



Складніші завдання

388. Урусіол – токсичний поліфенол, що міститься в отруйному плющі та інших рослинах, здатен викликати контактний дерматит. Це відбувається за рахунок окислення в хінон, крослінкінг протеїнів через нуклеофільні групи та наступну імунну відповідь на них. Проте пірокатехол, аналог, що не містить бічного ліпофільного ланцюга, не є небезпечним. Які можуть бути механізми впливу бічного ланцюга на токсичність цієї сполуки?



5.2. Фізичні властивості ліпідів та мембран. Модельні мембрани.

Пам'ятка:

- SUVs утворюються при сонікуванні й мають діаметр біля 50 нм. LUVs отримують екструзією.
- Один ліпід займає приблизно $0,8 \text{ нм}^2$ на поверхні одного з шарів мембрани.

Обов'язковий рівень

Приклад 1

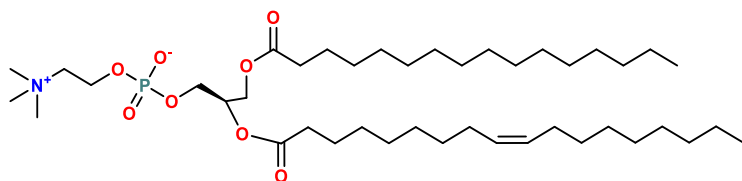
Штучна мембрана складається на 80% з POPC а та на 20% з POPG. Який середній заряд мембрани в розрахунку на 1 ліпід?

Розв'язок: POPC – Цвіттеріоний ліпід (сумарний заряд 0), а POPG – моноаніонний (-1). Відповідно середній заряд мембрани $(80\% \cdot 0 + 20\% \cdot (-1)) / 100\% = -0,2$.

- 389.** Яка товщина мембрани ракових клітин людини? ($\pm 30\%$)
- 390.** Клітини вигаданих бактерій K-lus мають форму ідеальної сфери діаметром 1 мкм. Оцініть з точністю ± 3 рази який відсоток маси таких бактерій становлять ліпіди мембрани.
- 391.** З яких ліпідів на вашу думку складається мембрана вірусу HIV-1 і чому?
- 392.** Намалюйте структуру DMPC.
- 393.** Посортуйте ліпіди по заряду. DOPC, DMPC, DMPG, DSPS, POPC, POPE, POPS, DPPG (розбийте на 2 групи).
- 394.** Після назви арахідонової кислоти в одному з підручників написано (20:4). Що значать ці цифри? Які цифри треба було б написати після назви олеїнової кислоти в такій номенклатурі?
- 395.** У вас є розчини 4 мМ DOPC в хлороформі та 2 мМ DOPG в суміші хлороформу та метанолу 3:1. Вам потрібно приготувати 2 мл розчину ліпосом з концентрацією ліпідів 500 мкМ та співвідношенням PC/PG=80:20. Скільки якого розчину потрібно взяти?
- 396.** Відомо, що бактерії змінюють відносну кількість жирних кислот, які вони виробляють, залежно від температури. Які зміни у вмісті жирних кислот ви очікували б в вільноживучих бактерій при зниженні температури довколишнього середовища на 20°C і чому?

397. Чому рецептори для пептидних гормонів розміщуються переважно на зовнішній стороні клітинної мембрани, а рецептори для стероїдних гормонів – переважно внутрішньоклітинні протеїни?

398. Як називається цей ліпід?

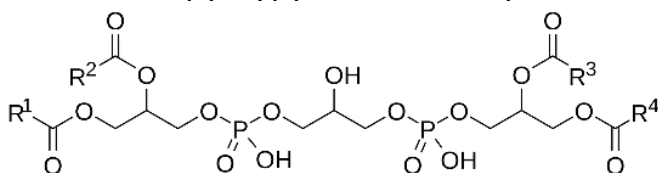


399. Як зміняться властивості мембрани, якщо в частині залишків олеїнової кислоти *цис*- подвійний зв'язок замінити на *транс*-зв'язок?

400. Ви приготували ліпосоми з двох типів модельних мембран: (i) 80% POPC, 20% DOPS та (ii) 90% POPC, 10% кардіоліпін (4x 18:2). Всі відсотки молярні. Яка з мембран на вашу думку буде мати більший поверхневий заряд?

401. Намалюйте структуру ліпиду DPPC.

402. Кардіоліпін складає близько 20% мембрани мітохондрій. У близько 50% всіх молекул кардіоліпіну в серці людини всі 4 жирні кислоти однакові – 18:2. Напишіть структуру такої молекули повністю.



403. Ви приготували ліпосоми з двох типів модельних мембран: (i) 80% POPC, 20% DOPS та (ii) 90% POPC, 10% кардіоліпін (4x 18:2). Всі відсотки молярні. Яка з мембран на вашу думку буде мати більший поверхневий заряд?

404. Штучна мембрана складається на 80% з DOPC а та на 20% з DOPS. У якій фазі вона перебуває при кімнатній температурі та при 37°C. Яка приблизно температура фазового переходу?

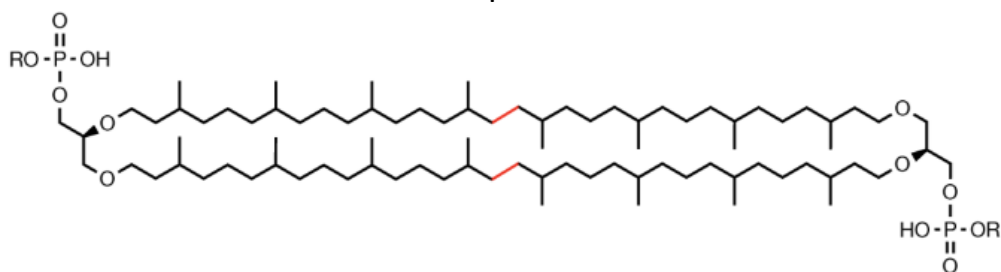
405. 4,1 мг DMPC розчинили в 1 мл хлороформу. 200 мкл такого розчину перенесли в грушовидну колбу на 10 мл та додали туди 1 мл хлороформу. Утворений розчини випарили у вакуумі постійно обертаючи колбу, щоб отримати тонку рівномірну плівку. В колбу додали 2 мл 10 мМ фосфатного буферу рН = 7,4 та сонікували на щуповому сонікаторі впродовж пів години при 40°C щоб отримати SUVs діаметром близько 50 нм. Яка концентрація ліпідів у утвореному розчині?

406. Склад мембрани вигаданої органели: 74% POPC, 7% DPPC, 7% DOPS, 6% різноманітні фосфатидилетаноламіни, 6% холестерол. Що ви можете сказати про заряд такої мембрани?

407. Експериментально при аналізі складу мембран часто визначали масову частку холестеролу по відношенню до інших ліпідів. Проте при приготуванні модельних мембрани переважно застосовують молярні співвідношення. В модельній мембрані молярне співвідношення між холестеролом та POPC становить 1:2. Яке співвідношення між ним по масі?

Середній рівень

408. Ось структура одного з ліпідів, які зустрічаються в мембранах архей. Які його принципові відмінності від звичних для людини фосфоліпідів та як вони впливають на властивості мембран?



409. Як зміняться властивості модельної мембрани утвореної з 80% POPC та 20% POPG якщо замінити POPG на POPS?

410. Що б сталося з клітиною, якщо б мембрана містила 98% нейтральних ліпідів і по 1% аніонних та катіонних?

411. Чому мембрану можна назвати "двовимірною рідиною"?

Приклад 2:

В ліпосомах діаметром 100 нм мембрана містить 0,1% мічених ліпідів. Скільки мічених ліпідів припадає на одну ліпосому?

Розв'язок:

Площа поверхні ліпосоми $S = 4\pi \cdot r^2 \approx 4 \cdot 3,14 \cdot 50 \cdot 50 = 31400 \text{ нм}^2$

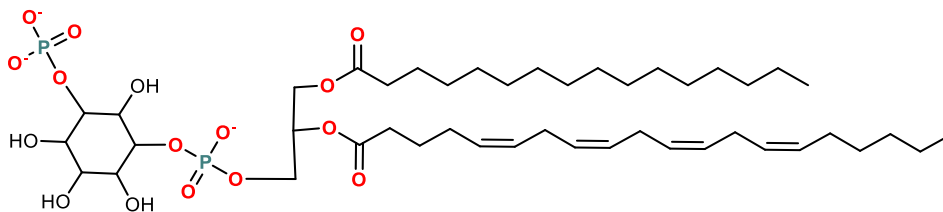
Врахуємо два шари $S_{\text{full}} = 2 \cdot 31400 \text{ нм}^2 \approx 63\,000 \text{ нм}^2$

Один ліпід займає приблизно $0,8 \text{ нм}^2$

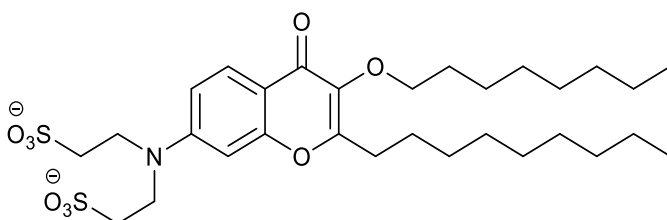
Відповідно в ліпосомі міститься приблизно $63000/0,8 \approx 78000$ ліпідів.

Ступінь мічення 0,1% (= 0,001). Відповідно ми очікуємо біля 78 мічених ліпідів на ліпосому

412. PI3P – ліпід який зустрічається в мембранах в невеликих кількостях. Уявіть, що ви хочете вивчати специфічність зв'язування певного протеїну до мембран, що містять PI3P. Для цього ви захотіли зробити модельну мембрану яка містила б 5% PI3P, а решта ліпідів – POPC. Для контролю ви вирішили взяти мембрану утворену з POPC та POPS з таким самим поверхневим зарядом. Який мав би бути її склад?



413. Чи буде проникати крізь мембрану така сполука?



414. Чому триацилгліцерини не можуть бути основним компонентом ліпідних мембран?

Приклад 3.

Коефіцієнт дифузії ліпиду в площині мембрани становить $1,3 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$. Оцініть, який час в середньому спотребиться ліпідам, щоб зміститися на 500 нм.

Розв'язок: Рух ліпиду в площині мембрани можна описати як двовимірну дифузію. Середнє зміщення за час t рівне $\sqrt{4Dt}$ (D – коефіцієнт дифузії). Отже, час, щоб подолати відстань r становить

$$t = \frac{r^2}{4D} = \frac{(500 \text{ нм})^2}{4 \cdot 1,3 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}} = \frac{(5 \cdot 10^{-5} \text{ см})^2}{4 \cdot 1,3 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}} = \frac{25 \cdot 10^{-10}}{5,2 \cdot 10^{-8}} \text{ с} \approx 4,8 \cdot 10^{-2} \text{ с} = 48 \text{ мс}$$

415. Яку відстань в середньому може подолати мембранний протеїн родопсин за 10 мс та за 1 с, якщо його коефіцієнт дифузії $5 \cdot 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$?

Складніші завдання

Приклад 4.

Студент хоче приготувати модельні мембрани у вигляді ліпосом діаметром біля 100 нм та мати концентрацію ліпідів у розчині біля 10 мкМ. Науковий

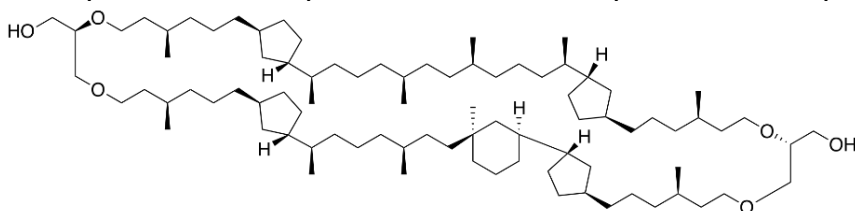
керівник вважає, що це погана ідея і каже що щоб ліпосоми рухалися вільно потрібно, щоб відстань між ними була хоча б вдвічі більша за їх діаметр. Оцініть, яку максимальну концентрацію ліпідів можна досягти за таких умов.

Розв'язок: Щоб відстань між 100-нм ліпосомами становила 2 діаметри відстань між центрами таких ліпосом має бути 300 нм. З достатньою точністю можна вважати, що у кожному кубі зі стороною 300 нм знаходиться 1 ліпосома. Тобто 1 ліпосома на $(300 \text{ нм})^3 = 2,7 \cdot 10^{-17} \text{ л}$, або, що те ж саме, $3,7 \cdot 10^{16}$ ліпосом/л. Кожна ліпосома діаметром 100 нм містить близько 78 000 ліпідів (див Приклад 1). Тому такий вміст ліпосом відповідає $3,7 \cdot 10^{16} \cdot 78000 = 2,89 \cdot 10^{21}$ ліпідів/л. Поділивши на число Авогадро ($N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$ молекул/моль) отримуємо концентрацію 4,8 мМ.

416. Віріони HIV-1 вкриті оболонкою, що формується з клітинної мембрани, та мають діаметр близько 120 нм. Цей параметр зазнає значного еволюційного тиску, адже чим менші віріони тим більше їх може продукувати уражена клітина. Поясніть, які біофізичні властивості ліпідних мембран заважають віріонам ставати ще меншими.

417. Вигадана лінія клітин ендцитозує власну мембрану зі швидкістю 1% за хвилину і синтезує стільки ж нових ліпідів. Ви розробили інгібітор синтезу нових ліпідів. Як можна його легко протестувати на даній клітинній лінії?

418. Гіпертермофільні археї (*Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*) містять в мембранах помітну кількість нетипового ліпиду кренархаеолу. Вважається, що наявність карбоциклів в його структурі допомагає зменшити проникність мембрани для протонів, що є критичним при високих температурах.



Чому ця молекула вважається ліпідом? Як вона орієнтується в мембрані? Який на вашу думку буде мати вплив додавання 0,5% в мембрану, утворену з POPC?

Література до розділу

- T. D. Pollard, W. C. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz, G. T.; **Cell Biology**, 3e, Johnson (2017), ISBN: 978-0-323-34126-4 // **розділи 13-16, 19**
- https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/index.html - Сайт, що містить багато детальних описів структури, ролі а синтезу різноманітних ліпідів з фокусом на MS аналіз

5.3. Протеїн-мембранна взаємодія, мембранні протеїни

Обов'язковий рівень

419. Пептид STARAKAIDASHYHA здатен взаємодіяти з мембранами, що містять 10% аніонних ліпідів. Намалюйте схематично як така взаємодія буде залежати від іонної сили розчину та від рН. Яку конформацію на вашу думку матиме цей пептид після зв'язування з мембраною й чому?

420. Яка мінімальна кількість амінокислот має бути в трансмембранній α -спіралі?

421. Пептиди неструктуровані у воді при додаванні ацетонітрилу часто набувають α -спіральної конформації. Поясніть, який зв'язок цього факту з тим, що тансмембранні домени протеїнів найчастіше є α -спіралями чи β -діжками, а повністю неструктуровані зустрічаються дуже рідко.

422. Синаптичні везикули, що слугують для передачі нейротрансмітерів, мають діаметр близько 40 нм. Їх мембрани містять доволі багато протеїнів, сумарно мембрану однієї везикули перетинає приблизно 600 α -спіральних доменів. Оцініть, який відсоток площі мембрани займають ці спіралі, якщо одна спіраль займає площу приблизно 1,5 нм².

Середній рівень

423. Вигаданий цитозольний протеїн X має неструктурований C-кінець з послідовністю VASYLSHKLIAR. При взаємодії X з рецептором на внутрішній частині цитоплазматичної мембрани його C-кінець лягає на поверхню мембрани й утворює α -спіраль. Які 4 амінокислоти з його послідовності найбільш відповідальні за таку поведінку і чому?

424. Аспірант додав 0,5% розчин SDS до гомогенізату певної тканини, що містить суміш розчинних білків та клітинних мембран. Після інкубації та центрифугування він помітив, що один з протеїнів, який за відсутності SDS осідав разом з мембранами, тепер залишається в надосаді. Чому так сталося? Чи дозволить така зміна протоколу зручніше визначати цей протеїн на нативному гелі по його ферментативній активності?

425. Уявіть, що мембрана якоїсь органели на 60% по масі складається з протеїнів. Оцініть, скільки приблизно ліпідів припадає на одну молекулу протеїну. Для спрощення вважайте, що середня довжина протеїну 200 амінокислот, а середня молекулярна маса ліпідів включно з холестеролом 700 г/моль.

Складніші завдання

426. Яка максимальна кількість амінокислот може бути в трансмембранній α -спіралі й чому?

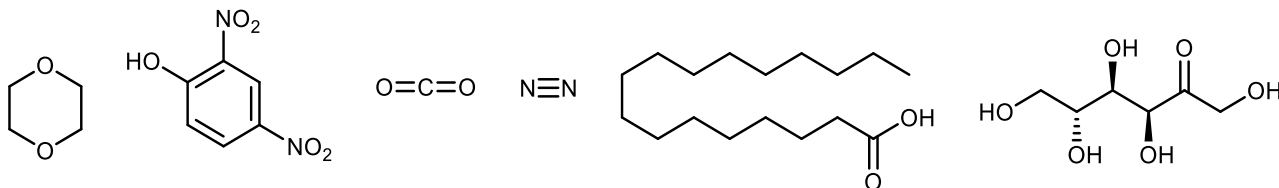
427. Взаємодії мембранних протеїнів коректніше описувати використовуючи не концентрацію молекул у розчині, а кількістю молекул на одиницю площі мембрани. Відомо, що якщо на 1 мкм^2 мембрани міститься 10 молекул протеїну А, то в середньому 8 з них перебувають в мономерній формі, а 2 – у формі димеру. Який, на вашу думку, буде відсоток димерів та мономерів А в мембрані клітини площею 50 мкм^2 , якщо в ній міститиметься 80 молекул протеїну А?

5.4. Транспорт крізь мембрану

Обов'язковий рівень

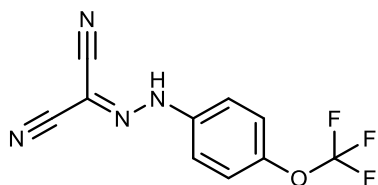
428. Поясніть, чому виноградка набухає, коли її кинути у воду, а свіжий огірок, коли його кинути в розсіл – стягується.

429. Які з цих речовин здатні проникати крізь мембрану?



430. Зараз вважається, що еволюційно першими біологічними молекулами були аналоги РНК, а мембрана в протоорганізмів виникла дещо згодом. Поясніть, чому це гарно узгоджується з тим, що ліпіди більшості живих організмів аніонні, цвіттеріонні й нейтральні, а от катіонні ліпіди на основі амінів в природі практично не зустрічаються.

431. FCCP є протонним іонофором, тобто дозволяє протонам проникати крізь мембрану клітини. Поясніть як він діє.



Складніші завдання

432. Молекули води доволі полярні й погано проходять через мембрани. Проте, клітинам потрібно пропускати помітні кількості води, скажімо при переході в середовище з іншим осмотичним тиском. Для цього в мембранах існують білки аквапорини – канали здатні пропускати молекули води з ефективністю приблизно 1 молекула раз на 2 нс. Припустіть, що мембрана еритроциту містить 100 000 копій аквапорину. Оцініть, за який час вона буде здатна пропустити 1 мкм³ води (що становить біль 20% типового об'єму еритроциту)?

433. Синаптична везикула має зовнішній діаметр близько 42 нм і містить біля 1750 молекул нейротрансмітера. Оцініть його концентрацію у везикулі припустивши що товщина мембрани близько 5 нм.

5.5. Трансмембранний потенціал

Пам'ятка:

- Рівняння Нернста: $E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$

E та E^0 - електродний потенціал, та стандартний електродний потенціал, відповідно, В

R - універсальна газова стала, 8,314 Дж/(моль·К);

T - абсолютна температура;

F - число Фарадея, 96485,3365 Кл/моль;

n - кількість електронів, які беруть участь в електрохімічному процесі

- Електрична складова: $\Delta G_{electric} = z \cdot F \cdot \Delta \psi$

Обов'язковий рівень

434. З однієї сторони мембрани рН=3,5, а з іншої 7,5. Яка мала б бути різниця потенціалів (в мВ) на сторонах мембрани щоб компенсувати схильність протонів проникати через мембрану за рахунок градієнту концентрації?

Середній рівень

Приклад 1

Розрахуйте зміну вільної енергії Гіббса (ΔG) при переміщенні іонів натрію всередину клітини якщо їх концентрація ззовні 200 мМ, а всередині 8 мМ, трансмембранний потенціал $\Delta \psi = -30$ мВ (всередині негативний). Температура клітини 37°C.

Розв'язок: Зміна вільної енергії складається з хімічної та електричної складових

$$\Delta G = \Delta G_{\text{chemical}} + \Delta G_{\text{electric}}$$

Хімічна складова це перехід Na^+ (зовні) \rightarrow Na^+ (всередині)

$$\Delta G_{\text{chemical}} = R \cdot T \ln \left(\frac{[\text{Na}^+]_{\text{всередині}}}{[\text{Na}^+]_{\text{зовні}}} \right) = \frac{8,314 \text{ Дж}}{\text{моль} \cdot \text{К}} \cdot (273 + 37) \text{ К} \cdot \ln \left(\frac{8}{200} \right) =$$

$$- 10972 \text{ Дж/моль}$$

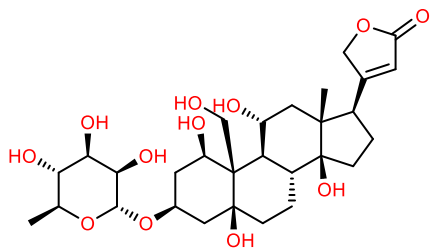
$$\text{Електрична складова: } \Delta G_{\text{electric}} = z \cdot F \cdot \Delta \psi =$$

$$= 1 \cdot 96485 \text{ (Дж/(вольт} \cdot \text{моль))} \cdot (-0,03 \text{ В}) = - 2894 \text{ Дж/моль}$$

$$\text{Сумарно: } \Delta G = \Delta G_{\text{chemical}} + \Delta G_{\text{electric}} = - 10972 \text{ Дж/моль} - 2894 \text{ Дж/моль} =$$

$$- 13866 \text{ Дж/моль} \approx 13,9 \text{ кДж/моль}$$

435. Племена на території Сомалі та Руанди використовували стріли з отрутою строфантин, карденоліпідом, який містить стероїдну частину та цукрові залишки. Строфантин блокує натрій-калієвий насос (Na^+/K^+ -АТФаза). Наскільки швидко і як на вашу думку діє ця отрута?



Складніші завдання

436. Коли люди хворіють на грип температура тіла часто зростає від 36°C до 39°C . Як така зміна температури впливає на потенціал спокою в нейронах? Використовуйте в розрахунках типові концентрації іонів.

437. Оцініть, скільки молекул АТФ потрібно витратити для викачування 1000 іонів кальцію з клітини, якщо їх концентрація в цитоплазмі $0,4 \text{ мМ}$, а ззовні 2 мМ ? Мембранний потенціал клітини становить 60 мВ , а температура 37°C .

438. Клітина X здатна захоплювати глюкозу з зовнішнього середовища за рахунок градієнту концентрації іонів натрію всередині та ззовні клітини пропускаючи один іон на кожен молекулу глюкози. Концентрація глюкози в такій клітині становить 10 мМ , а $[\text{Na}^+] = 5 \text{ мМ}$. Чи зможе клітина X закачувати глюкозу таким механізмом з середовища де її вміст $0,1 \text{ мМ}$, $[\text{Na}^+] = 150 \text{ мМ}$, а температура 10°C ? Трансмембранний потенціал $\Delta \psi = -50 \text{ мВ}$.

Біофізика руху

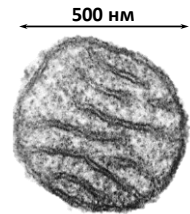
6. Молекулярні машини. Рух. Ріст.

АТФ синтаза: будова, принцип функціонування. Бактеріальна флагаела. Цитоскелет. Актин. Тубулін. Моторні протеїни. Дифузія. Джгуттик еукаріотів. Рух клітин.

6.1. АТФ-синтаза й біоенергетика.

Обов'язковий рівень

439. На рисунку зображено мітохондрію з тканини легенів (зображення отримане трансмісійною електронною мікроскопією). Оцініть площу поверхні її зовнішньої та внутрішньої мембрани.



440. Намалуйте схематично АТФ синтазу мітохондрій людини й покажіть які саме частини в ній обертаються, а які – ні.

441. В мітохондріях печінки людини співвідношення Комплекс I : Комплекс III : Комплекс IV : АТФ-синтаза приблизно 1 : 3 : 6 : 3. Оцініть, скільки приблизно протонів в секунду мають перекачувати комплекси I-IV в групі, щоб забезпечити роботу однієї АТФ-синтази, яка в середньому синтезує близько 50 молекул АТФ в секунду й витрачає на одну молекулу АТФ близько 3 протонів.

442. Кількість протонів, яку має пропустити крізь себе АТФ-синтаза на один повний оберт ротора F_0 , може помітно відрізнятися між організмами: від 8 в мітохондріях хребетних, до 14 в хлоропластах вищих рослин. Скільки протонів потрібно для синтезу молекули АТФ в кожному з цих випадків?

Середній рівень

443. Для ілюстрації розповіді про співвідношення поверхні та об'єму студент розглянув уявну бактерію, яка має форму циліндра довжиною 1 мкм та діаметром 50 нм. Які проблеми з мембраною та синтезом АТФ мала б така бактерія?

Складніші завдання

444. Під час одного клітинного циклу бактерія *E.coli*. витрачає на синтез білків, ДНК та ліпідів нової клітини енергію еквівалентну гідролізу приблизно 5 мільярдів молекул АТФ, а інтервал між поділами становить 30 хв. Оцініть кількість АТФ-синтаз в клітині, якщо одна з них здатна синтезувати близько 30 молекул АТФ за секунду. Це буде завищена оцінка, адже значну частину енергії клітина використовує не у формі АТФ. Наскільки густо вони розміщені на мембрані при такій кількості (тобто яка площа мембрани відповідає одній копії АТФ-синтази) і чи є реалістичною така величина? Для спрощення вважайте, що клітина бактерії, це циліндр довжиною 2 мкм і діаметром 1 мкм.

6.2. Джгутики бактерій.

Обов'язковий рівень

445. Всі відомі бактеріальні джгутики мають порожнину всередині, якою транспортуються протеїни під час їх росту. Яку принципову перевагу дає цей підхід клітині?

446. Оцініть, за порядком величини кількість копій протеїнів в бактеріальному джгутику довжиною 2 мкм.

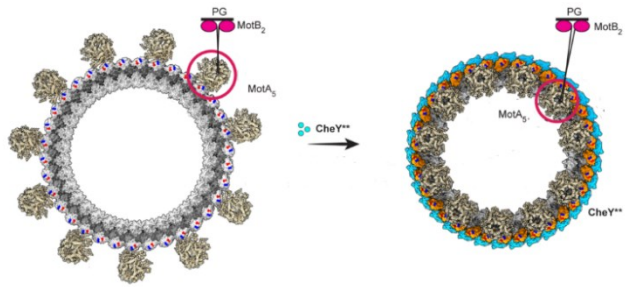
447. Намалюйте схематично механізм бактеріального джгутика. Вкажіть через який конкретно протеїн протони проходять крізь мембрану для створення рухомої сили.

448. Чому бактерії, яким потрібно швидше рухатись частіше мають кілька джгутиків, а не просто один більший джгутик?

Середній рівень

449. До складу джгутика *E.coli*. входить близько 20 тисяч молекул білка флагеліну (~50 кДа, ~450 а.к.). Вважається, що одна рибосома синтезує білок з швидкістю близько 20 амінокислот за секунду. Оцініть, скільки рибосом одночасно повинні працювати на синтез флагеліну джгутика. Клітина ділиться раз в 30 хв і за цей час джгутик повинен сформуватися повністю.

450. На малюнку схематично наведено механізм перемикання напрямку обертання бактеріального джгутика. Вкажіть, які протеїни обертались, та як до, та після перемикання. Можете скористатися статтею Tan et al 2024, doi:10.1038/s41422-024-01017-z.



451. Уявіть, що ви пишете інструкцію для бактерії по складанню позаклітинної частини джгутика в стилі "виводимо 48 копій білка А, потім 20-30 копій білка В,..." Скористайтесь будь-якими літературними джерелами і спробуйте написати її максимально чітко.

Складніші завдання

452. Бактеріальний джгутик обертається за рахунок молекулярного мотору, що використовує трансмембранний градієнт протонів. При дослідженні певного виду бактерій встановили що на один оберт вона витрачає еквівалент 1200 ± 100 молекул АТФ (гідроліз 1 АТФ ≈ 50 кДж/моль). Оцініть, скільки приблизно протонів потрібно пропустити через мембрану цієї бактерії для одного оберту джгутика. Ця бактерія живе в холодних водах ($t = 5^\circ\text{C}$) з $\text{pH} = 6,5$, але в її клітині середовище нейтральне ($\text{pH} = 7$). Мембранний потенціал цього виду бактерій $\Delta\psi = -150$ мВ.

453. *E.coli* споживає близько 1000 протонів на один оберт джгутика. Різниця електрохімічного потенціалу протонів між сторонами мембрани становить близько 20 кДж/моль. Припустіть, що клітина бактерії має форму циліндра з сферичними торцями діаметром 800 нм, а джгутик робить 100 обертів за секунду. На основі цього оцініть за порядком величини максимальну швидкість руху бактерії. Як вона співставляється з експериментальною величиною ~ 20 мкм/с? Сила тертя для сфери чи циліндра з сферичними торцями, що рухається в рідині становить $F = 6\pi\eta r v$, де в'язкість води $\eta \approx 0,001$ Па·с.

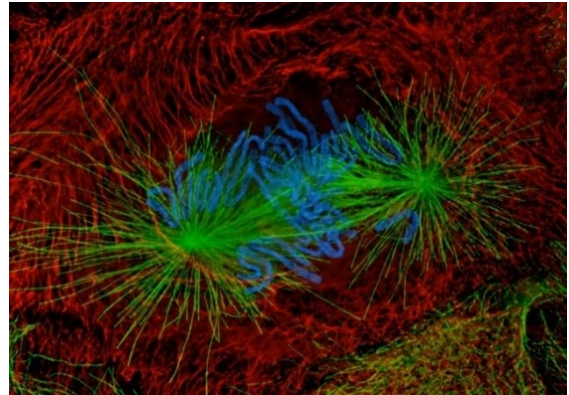
454. Патогенні бактерії *Campylobacter jejuni* відомі тим, що не можуть використовувати цукри як джерело енергії та тим, що їх флагела може створювати набагато сильніший крутний момент, ніж флагели інших бактерій, скажімо кишкової палички чи сальмонели. Роздивіться тривимірну структуру її молекулярного мотору в базі даних структур електронної мікроскопії (<https://www.ebi.ac.uk/emdb/EMD-16723>) та спробуйте схематично перемалювати структуру та показати, де розміщені статорні комплекси і скільки їх в цьому молекулярному моторі.

455. В недалекому майбутньому один амбітний аспірант вирішив сконструювати бактерію, яка буде рухатись за рахунок обертання не джгутика, а гвинта по типу гребного гвинта кораблів. Його ідея полягала в тому, щоб взяти бактерію з однією флаголю, використати її молекулярний мотор та апарат для виведення протеїнів, але методом генної інженерії прибрати в неї протеїни, що утворюють джгутик, і натомість додати протеїни, які будуть збиратися в пропелер діаметром близько 50 нм. Професор, до якого він прийшов порадитись, зарубав проєкт словами "По-перше такий проєкт – грубе порушення біобезпеки. По-друге, це надто складно." Які принципові труднощі виникнуть при розробці механізму самозбирання такого пропелера і що обмежуватиме його рушійну силу? Розгляньте питання контролю стехіометрії, локалізації, симетрії, міцності. (Задача розрахована на групову роботу).

6.3. Моторні протеїни та цитоскелет.

Обов'язковий рівень

456. На зображенні в псевдокольорах показано одну зі стадій поділу клітини. Що зафарбовано зеленим кольором? Чи показано тут актин, ДНК, проміжні філаменти? [джерело зображення <https://twitter.com/manuelthery/status/1354463483757256707>]



457. Везикула транспортується від тіла клітини до терміналу аксона за допомогою кінезину вздовж мікротрубочок і проходить 1,5 мм. Скільки "кроків" зробить протеїн та скільки молекул АТФ потрібно для такого транспортування? Вважайте, що везикулу одночасно тягнуть в середньому 3 молекули кінезину та знехтуйте їх відпаданню.

458. Припустіть, що в умовах певної клітини гідроліз АТФ здатен виділити 50 кДж/моль. Яку максимальну силу може прикласти молекула кінезину до вантажу, якщо вона використовує 1 молекулу АТФ на крок довжиною 8 нм?

459. Оцініть швидкість росту (+)-кінця актинової філаменти (нм/с) в середовищі, що містить 5 мкМ Актин-АТФ. Константа швидкості реакції приєднання за даних умов становить $12 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

460. Деполімеризація актинової філаменти з (-)-кінця відбувається зі швидкістю біля 1 мкм/хв. Оцініть константу швидкості дисоціації мономеру від (-)-кінця.

461. Мікротрубочка складається з 13 протофіламентів, утворених з α , β -тубулінових димерів, довжина кожного з яких вздовж осі мікротрубочки близько 8 нм. Діаметр мікротрубочки становить 25 нм. Оцініть а) скільки мономерів в мікротрубочці довжиною 1 мкм; б) який діаметр гетеродимеру тубуліну.

462. Щоб зробити один крок довжиною 8 нм моторний протеїн кінезин витрачає 1 молекулу АТФ. Скільки енергії він витратить на подорож довжиною 100 км? Порівняйте це з кількістю енергії, яку витрачає типовий автомобіль, на таку ж масу. Вважайте, що кінезин рухається без навантаження. (Задача передбачає вільний пошук в інтернеті необхідних додаткових даних.)

463. Моторні білки кінезин та динеїн містять по 2 головки для руху по мікротрубочці. Чому це набагато ефективніше, ніж використовувати вдвічі більшу кількість молекул білка, що містили б тільки одну мікротрубочку?

464. Проміжні філаменти в клітині складаються з димерів білка, які з'єднуються в тетрамери, а потім формують довгі неполярні волокна. Довжина одного тетрамера близько 60 нм. Скільки часу потрібно для росту проміжного філамента довжиною 1 мкм, якщо приєднується в середньому 0,5 мономера в секунду?

Середній рівень

465. Деякі з нейронів людини, наприклад ті, що йдуть від хребта до пальців ніг, можуть мати аксони довжиною до 1 метра. Проте, діаметр таких аксонів доволі малий, порядку 1 мкм і вільна дифузія молекул у них може вважатися одновимірною, $(\Delta x)^2 = 2Dt$. Типовий коефіцієнт дифузії протеїнів $D = 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$. Оцініть, скільки часу потрібно, щоб протеїн синтезований біля ядра такого нейрону досягнув кінця аксону і порівняйте це з часом потрібним для доставки його системою моторних протеїнів.

466. В одному з типів клітин тубулінова мікротрубочка росте зі швидкістю близько 1 мкм/хв. Приблизно раз в 5 хв настає катастрофа після чого вона починає деполімеризуватися з швидкістю 10 мкм/хв. В середньому через хвилину після початку катастрофи може відбутися "рятування" – зупинка деполімеризації та відновлення росту. Намалюйте схематично як змінюватиметься довжина 20-мкм мікротрубочки з часом в таких умовах.

467. Джгутик людських сперматозоїдів рухається за рахунок виляння, яке викликається ковзанням спеціальних мікротрубочок одна вздовж одної під дією моторного протеїну динеїну. Поясніть, чому така схема дозволяє йому розвивати набагато вищу потужність ніж бакетріальна флагела.

Складніші завдання

468. Коефіцієнт дифузії GFP в цитоплазмі становить приблизно $1.5 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$. Оцініть, за скільки часу в середньому молекула цього протеїну могла б дістатися від ядра до найдалшої точки нейрону довжиною 10 см за відсутності транспортування. Можна вважати, що аксон тонкий і дифузія одновимірною.

469. На основі цих даних про зміну позиції кінезину з часом оцініть середню швидкість його руху в експерименті, середню довжину кроку, середній час

Приклад 1

Ріст актинових філамент в клітинах здатен змінювати їх форму, що використовується в т. ч. й для руху. Це можливо за рахунок того, що збирання актину в філаменти супроводжується гідролізом АТФ. Вважайте, що в умовах певної клітини приєднання актину супроводжується зміною вільної енергії 50 кДж/моль та подовженням філаменти на 2,5 нм та оцініть максимальну силу з якою може тиснути фібрила актину на мембрану під час росту.

Розв'язок:

Спочатку розрахуємо зміну вільної енергії на одну молекулу:

$$(50\ 000\ \text{Дж/моль}) / 6,02 \cdot 10^{23}\ \text{молекул/моль} \approx 8,3 \cdot 10^{-20}\ \text{Дж/молекулу}$$

Потім скористаємось формулою з класичної механіки: енергія це добуток сили на відстань

$$E = F \cdot L \rightarrow F = E/L = 8,3 \cdot 10^{-20}\ \text{Дж} / 2,5 \cdot 10^{-9}\ \text{м} = 3,3 \cdot 10^{-11}\ \text{Дж/м} = 3,3 \cdot 10^{-11}\ \text{Н} = 33\ \text{пН}$$

(33 pN)

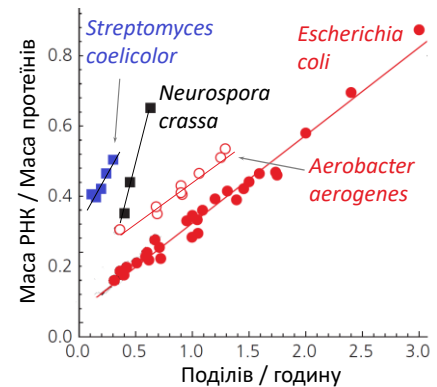
473. Під час м'язового скорочення головка міозину витрачає одну молекулу АТФ на крок довжиною близько 10 нм. На товстій філаменті м'язової клітини довжиною 1,5 мкм розташовано близько 300 міозинових головок з кожного боку. Проте, під час активного скорочення, одночасно працює лише близько 20% головок. На яку відстань у теорії може зсунути тонка філамента (актин), якщо всі задіяні головки зроблять по одному кроку? Скільки молекул АТФ буде на це витрачено? Яку силу (в мікроньютонах) здатна розвинути така система? Втрати при переході хімічної енергії в механічну становлять близько 50%. Оцініть за порядком величини на основі цих даних максимальну силу, яку здатен розвинути м'яз діаметром 5 см, якщо відстань між осями сусідніх товстих філамент 40 нм. Порівняйте її з реальною силою м'яз рук людини.

6.4. Ріст і поділ клітин.

474. Уявіть РНК(+) вірус з діаметром віріону 110 нм що та містить 2 копії РНК довжиною близько 8000 основ кожна. Яку приблизно частину маси віріону становлять РНК, протеїни й ліпіди якщо товщина його мембрани близько 6 нм, а маса води приблизно рівна третині маси протеїнів? Вважайте, що середня густина протеїнів 1,3 г/мл, а РНК 1,4 г/мл.

475. Організм дорослої людини складається з приблизно з 10^{13} клітин й має масу близько 75 кг. Оцініть середню масу й об'єм клітини людини.

476. На діаграмі наведено взаємозв'язок між тим наскільки часто відбувається поділ в деяких бактеріальних клітинах та співвідношенням маси РНК до маси протеїнів у них. Поясніть, що може бути причиною лінійного взаємозв'язку. (Діаграму побудовано на основі даних Lynch, Evolutionary Cell Biology, 2024.)



477. Бактерії вигаданого виду мають форму циліндру діаметром 400 нм. Вони ростуть видовжуванням циліндра при сталому діаметрі й діляться на дві рівні частини коли він досягає в довжину 3000 нм. Назвіть 3 основні (на вашу думку) переваги такої стратегії над рівномірним ростом у всі напрямках.

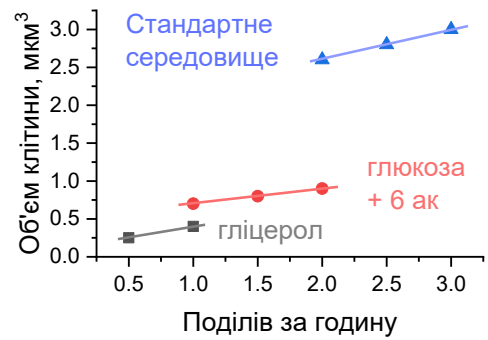
478. В клітин *Hela* ядро має близько 3000 нуклеопорних комплексів (NPC), кожен з яких здатен виводити мРНК зі швидкістю 10 000 нуклеотидів/с. Вважайте, що цей тип клітин потребує близько 100 000 різних мРНК. Оцініть, як би вплинуло на максимальну швидкість поділу клітини зменшення кількості нуклеопорних комплексів до 30. Що стримує клітину від створення ще більшої кількості NPC?

Приклад

Клітини вигаданої лінії *k-lush* діляться раз на 10 годин. Під час мітозу вони припиняють екзо- та ендоцитоз в середньому на 10 хвилин. Культуру таких клітин протягом 4 хв обробляли дезінфекційним розчином, що містить токсин, який ендоцитозується й гарантовано вбиває клітини. Яка частка клітин виживе?

Розв'язок: Нехай клітини обробили токсином о 12:06. Тоді виживуть всі клітини, що почали поділ між 12:00 та 12:06, тобто протягом 6 хв. В середньому клітини діляться раз на 600 хв. Тобто виживе $6/600 = 1\%$ популяції.

479. Студент виконував курсову роботу в лабораторії, де вивчають механізм регуляції поділу клітин прокариотів. Він вивчав як впливає поживність середовища на середній час поділу та розмір клітини й отримав дані схематично зображені на рисунку (дані приблизно відповідають реальній ситуації з *E. coli.*, doi: 10.1016/j.cub.2014.12.009). Якому з механізмів регуляції поділу краще відповідає експеримент: а) поділу через сталий час. б) поділу при сталому розмірі, в) поділу при сталому прирості? Наскільки негомогенною є популяція клітин за однакових умов (в скільки разів може відрізнятись їх маса) та наскільки велика різниця між клітинами вирощеними за різних умов?



480. На рисунку схематично зображено зміну маси вигаданої еукаріотичної клітини та її ДНК з часом. Зобразіть схематично фази клітинного циклу.



Інструментальні методи

7. Фізичні методи в біології

7.1. Абсорбція

Пам'ятка:

- Абсорбція світла (оптична густина) пропорційна відстані, яку проходить світло крізь розчин (L) та молярній концентрації розчину (C):

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot L$$
 Коефіцієнт пропорційності (коефіцієнт поглинання, коефіцієнт екстинкції) – ε – абсорбція розчину довжиною оптичного шляху 1 см і концентрацією 1 моль/л. Інколи абсорбцію позначають OD.
- Абсорбція світла рівна десятковому логарифму відношення інтенсивності світла, що потрапило на розчин (I_0) до інтенсивності світла, що вийшло з розчину (I_1)

$$A = \text{Log}(I_0/I_1)$$
 Наприклад, розчин з $A = 2$ пропускає 1% світла.
- Більшість комерційних спектрофотометрів погано вимірюють поглинання більше 2,5, але цю проблему можна обійти використовуючи коротший оптичний шлях.
- Комерційні барвники мають $\varepsilon = 50\,000 \dots 150\,000 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$
- Онлайн-довідник з спектрами поглинання багатьох флуорофорів.
<https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/class.html>.
- Триптофан має $\varepsilon_{280} = 5700 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Тирозин $\varepsilon_{280} = 1280 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Поглинанням інших амінокислот на 280 нм можна знехтувати.
- Калькулятор коефіцієнтів поглинання пептидів <https://pepcalc.com>.
- ДНК та РНК поглинають на 260 нм. Інтенсивність поглинання залежить від конкретних нуклеотидів, але якщо вона невідома то можна застосувати приблизну формулу: $C(\text{мкг/мл}) \approx A_{260} \cdot 50$
- Калькулятор поглинання ДНК/РНК
<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

Обов'язковий рівень**Приклад 1**

Яка оптична густина 1-см шару 1 мкМ розчину родаміну, якщо коефіцієнт поглинання на довжині хвилі вимірювання становить $\epsilon = 80\,000\text{ см}^{-1}\text{ М}^{-1}$?

Розв'язок: $A = \epsilon \cdot L \cdot C = 1\text{ см} \cdot 10^{-6}\text{ М} \cdot 80\,000\text{ см}^{-1}\text{ М}^{-1} = 0,08$

481. Яка оптична густина розчину АТФ з концентрацією 10 мкМ? ($d = 1\text{ см}$, $\epsilon_{260} = 15400\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$)

482. У спектрофотометричному аналізі розчину білка було отримано значення абсорбції (оптичної густини) $A = 0,75$ при довжині хвилі 280 нм. Молярний коефіцієнт поглинання білка при цій довжині хвилі становить $\epsilon = 15900\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, а розміри кювети – $10 \times 10\text{ мм}$. Визначте концентрацію білка в розчині в мкМ.

483. Який відсоток світла пропускає кювета, якщо оптична густина становить 1,3?

484. Яка довжина хвилі відповідає зеленому світлу?

485. Чому речовини, які мають максимум поглинання на 350-370 нм нам здаються безбарвними, а ті, що поглинають на 420-450 нм – жовтими?

486. Чому амінокислота триптофан має молярний коефіцієнт екстинкції у десятки разів менший, ніж синтетичні флуоресцентні барвники?

Приклад 2

Яке буде поглинання на 280 нм 1 мМ розчину пептиду WHEREISFRANKIVSK в 1-сантиметровій кюветі?

Розв'язок: Спочатку розрахуємо коефіцієнт поглинання пептиду. На 280 нм поглинають триптофан (W, $\epsilon = 5700\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) та тирозин (Y, $\epsilon = 1280\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$). В наведеній послідовності є тільки триптофан WHEREISFRANKIVSK. Тобто коефіцієнт поглинання пептиду становить $\epsilon = 5700\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$. У випадку довших послідовностей де важко шукати символи амінокислот вручну доречно скористатися онлайн-калькуляторами коефіцієнтів поглинання пептидів.

Далі розраховуємо поглинання $A = \epsilon \cdot L \cdot C = 1\text{ см} \cdot 0,001\text{ М} \cdot 5700\text{ см}^{-1}\text{ М}^{-1} = 5,7$ – надто висока величина для практичного вимірювання.

487. Розчин пептиду NEWPEPTIDE має поглинання на 280 нм з OD = 0,81 в 4 мм кюветі. Оцініть його концентрацію в мг/мл.

488. Розчин олігонуклеотиду CAACATTACA має OD = 0,33 на 260 нм (1-см кювета). Яка його концентрація в нг/мкл та в мкМ?

489. Який коефіцієнт поглинання (екстинкції) барвника молекулярною масою 745 якщо при розчиненні $7,1 \pm 0,1$ мг в 1000 ± 2 мкл етанолу утворився розчин з поглинанням $0,451 \pm 0,002$ на максимумі (455 нм)?

Приклад 3

Яка концентрація барвника в базовому розчині, якщо при додаванні $10 \pm 0,2$ мкл такого розчину до 800 ± 2 мкл етанолу оптична густина становить $0,711 \pm 0,003$ (1-см кювета). $\epsilon = 80\,000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$?

Розв'язок: Спочатку рахуємо значення, а потім оцінимо похибку.

Концентрація барвника в кюветі: $C = A/(\epsilon \cdot L) = 0,711 / (1 \text{ см} \cdot 80\,000 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}) \approx 88,9 \text{ мкМ}$

Концентрація у базовому розчині вища пропорційно розведенню, тобто $88,9 \text{ мкМ} \cdot (800+10)/10 \approx 7200 \text{ мкМ} = 7,2 \text{ мМ}$

Відносна похибка визначення може бути оцінена як сума відносних похибок вимірювань, бо при обрахунках виконувалось множення та ділення (див. відповідний розділ)

Поглинання: $0,003/0,711 \approx 0,42\%$

Доданий об'єм: $0,2/10 \approx 2\%$

Об'єм у кюветі: $2/800 \approx 0,25\%$

Сумарно: $\pm 2,67\%$

Тобто концентрація барвника $7,2 \text{ мМ} \pm 2,67\% = (7,2 \pm 0,2) \text{ мМ}$

490. Базовий розчин барвника з концентрацією 10 мкМ має абсорбцію 0,700. До 1 мл цього розчину додали 1,5 мл води. Яка буде оптична густина утвореного розчину?

491. Для ПЛР експерименту ви замовили праймер TCTAGAACTAGTGGATC у комерційної фірми. Замовлений продукт вам надіслали в мікропробірці як тверду речовину, що скоріш за все, є натрієвою чи калієвою сіллю. Щоб приготувати розчини відомої концентрації ви розчинили весь отриманий продукт в 0,5 мл буферного розчину і відібрали 2 мкл для вимірів на п'єдестальному спектрофотометрі. Після перерахунку на 1 см OD розчину становило $5,04 \pm 0,05$. Розрахуйте концентрацію праймеру в розчині.

492. Оптична густина розчину олігонуклеотиду CUCAGUCA на 260 нм становить 0,120 (1 см кювета). Оцініть його концентрацію.

493. Спектрофотометр дає похибку $\pm 0,002$ і дозволяє виміри для OD < 2. З якою точністю на ньому можна виміряти концентрацію 10 мкМ розчину триптофану?

494. Спектрофотометр дає похибку $\pm 0,001$ і дозволяє виміри для OD < 2. З якою точністю на ньому можна виміряти концентрацію 1 мг/мл розчину триптофану?

495. У вас є розчин флуоресцеїну в етанолі з концентрацією приблизно 8 мг/мл. Ви хочете дізнатися концентрацію більш точно й можете міряти спектри поглинання в 1 см кюветі. Опишіть як це зробити.

496. Щоб визначити коефіцієнт поглинання нового барвника Me3HC його наважку масою 5 мг розчинили в 1000 мкл метанолу. 5 мкл утвореного розчину додали в 1 см кювету з 1 мл метанолу й отримали розчин з оптичною густиною 0,851 на максимумі. Оцініть коефіцієнт поглинання Me3HC, якщо його молекулярна маса становить 555 г/моль.

497. 6 мг барвника MeNR розчинили в 800 мкл метанолу. 20 мкл утвореного розчину додали в мірну колбу об'ємом 25 мл, перемішали. Поглинання утвореного розчину в 1 см кюветі становило 0,556 на максимумі. Оцініть коефіцієнт поглинання MeNR, якщо його молекулярна маса становить 644 г/моль. Для чого розведений розчин готували в мірній колбі, а не напряду в кюветі?

498. $3 \pm 0,1$ мг нового барвника PIF розчинили в 800 мкл метанолу. 5 мкл утвореного розчину додали в 1 см кювету з 2500 мкл метанолу й отримали розчин з поглинанням $0,777 \pm 0,002$ на максимумі. Оцініть коефіцієнт поглинання PIF та його похибку, якщо його молекулярна маса становить 500 г/моль, а похибка вимірювання об'ємів 0,2 мкл.

499. З якою максимальною точністю можна визначити концентрацію барвника, якщо його поглинання становить 0,055, а похибка вимірювання спектрофотометром $\pm 0,001$?

500. У вас є 1 мл концентрованого розчину міченого пептиду Fluorescein-HALYTSKASTREET. Ви взяли 5 мкл цього розчину, додали в 1 см кювету з 1000 мкл буферу й отримали поглинання 0,258 на 490 нм (для флуоресцеїну $\epsilon = 87000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Яка концентрація пептиду у концентрованому розчині?

501. У вас є 10 мл концентрованого розчину барвника з $\epsilon = 96000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в спирті. Якщо цей розчин капнути на спектрофотометр п'єдестального типу з оптичним шляхом 0,5 мм, то отриманий спектр буде зашкалений і не дозволить провести розрахунки. Якщо 2 мкл цього розчину додати до 98 мкл спирту й перемішати то поглинання розведеного розчину становитиме 0,202 (оптичний шлях 0,5 мм), що відповідає OD = 4,04 при оптичному шляху 1 см. Розрахуйте концентрацію барвника у вихідному розчині. Яка похибка цієї величини, якщо об'єми вимірювалися з похибкою $\pm 0,15$ мкл?

502. Додавання надлишку DTNB (реактиву Елмана) до 20 мкМ розчину білка призводить до збільшення поглинання на 412 нм на 0,15 ($d = 1 \text{ cm}$). У денатуруючому буфері збільшення становить 0,29 одиниці. Скільки цистеїнів

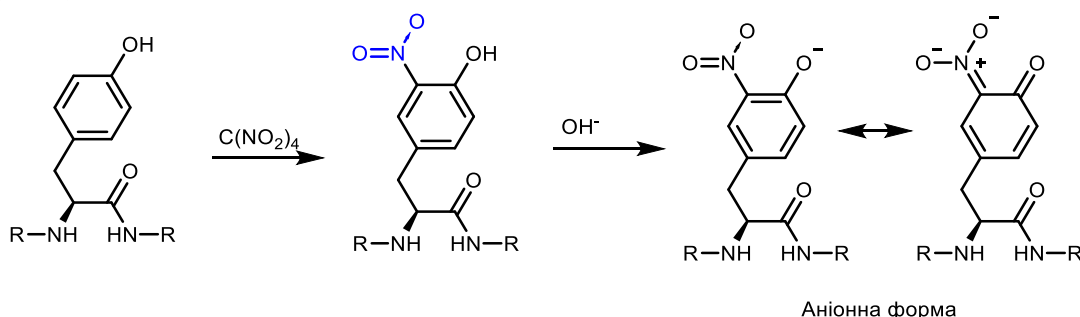
знаходяться на поверхні білка та в його глибині, скільки в молекулі білка дисульфідних містків? $\epsilon(\text{TNB}^-) = 14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

503. Вміст алкоголю в крові людини визначається ферментативно, шляхом реакції етанолу з NAD^+ у присутності ферменту алкогольдегідрогенази з утворенням NADH . Утворення NADH моніторять по поглинанні на довжині хвилі 340 нм. Нижче наведено динаміку зміни поглинання для стандартного розчину етанолу (0,100 мас%) та для невідомого зразка. Оцініть концентрацію етанолу у зразку та її невизначеність.

Час, с	A(стандарт)	A(зразок)
0	0,006	0,005
30	0,078	0,054
60	0,149	0,105
90	0,221	0,147
120	0,302	0,198
150	0,368	0,248

504. З культури бактеріальних клітин виділили рекомбінантні плазміди (ДНК) й ресуспендували їх отримавши 500 мл базового розчину. Якщо 20 мкл цього зразка додати у кювету з 1000 мкл дистильованої води, то поглинання цього розведеного зразка при 260 і 280 нм буде 0,551 та 0,333, відповідно. Яка концентрація ДНК у базовому розчині?

505. При обробці протеїну тетранітрометаном тирозинові залишки нітруються з утворенням нітротирозину, який в лужному середовищі депротонується утворюючи жовтуватий аніон ($\epsilon_{428} = 4100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



На основі даних поглинання протеїну, обробленого тетранітрометаном, при різних рН оцініть рКа нітротирозину.

pH	5,50	5,86	6,09	6,41	6,54	7,26	7,42	7,69	7,90	8,4
A428	0,13	0,134	0,138	0,158	0,168	0,234	0,252	0,268	0,284	0,312

Середній рівень

506. При визначенні концентрації протеїну методом Бредфорда 10 мкл стандартного розчину протеїну концентрацією 500 мкг/мл додали до реактиву й отримали після інкубації значення поглинання 0,123. Якщо додати 20 мкл, то значення буде 0,250. Якщо ж додати 5 мкл розчину цього ж протеїну невідомої

концентрації, то поглинання становитиме 0,077. Яка концентрація невідомого розчину?

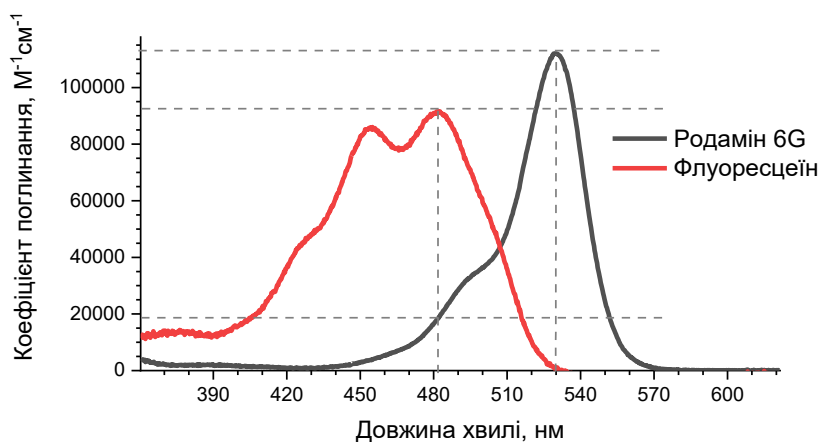
507. При визначенні концентрації протеїну методом Бредфорда використовували стандартний розчин концентрацією 400 мкг/мл доданий в об'ємах 0-20 мкл. Зразки S1 та S2 додали до реактиву в об'ємі 10 та 40 мкл, щоб отримати значення в більш зручному діапазоні й покращити точність вимірів. Яка концентрація у зразках S1 та S2 на вашу думку?.

Зразок	V, мкл	A
стандарт	0	0,000
стандарт	5	0,048
стандарт	10	0,104
стандарт	20	0,221
S1	10	0,051
S1	40	0,188
S2	10	0,181
S2	40	0,601

508. Барвник IFU має максимум поглинання на 490 нм ($\epsilon = 90000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), а також частково поглинає на 280 нм ($\epsilon = 28000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). У вас є пептид SWARYCHIW, який мітили по цистеїну maleїмідною похідною IFU й очистили від надлишку барвника хроматографією. Розчин цього пептиду показує OD 0,991 на 490 нм та 0,551 на 280 нм. Оцініть ступінь мічення.

509. 5 мкл розчину барвника ($\epsilon = 78000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) додали в 1 см кювету з 800 мкл буферу і отримали поглинання 0,052. Яка концентрація барвника та її похибка, якщо похибка вимірювання об'ємів $\pm 0,3$ мкл, а вимірювання поглинання $\pm 0,002$? Наскільки збільшиться точність вимірів, якщо додати не 5, а 20 мкл?

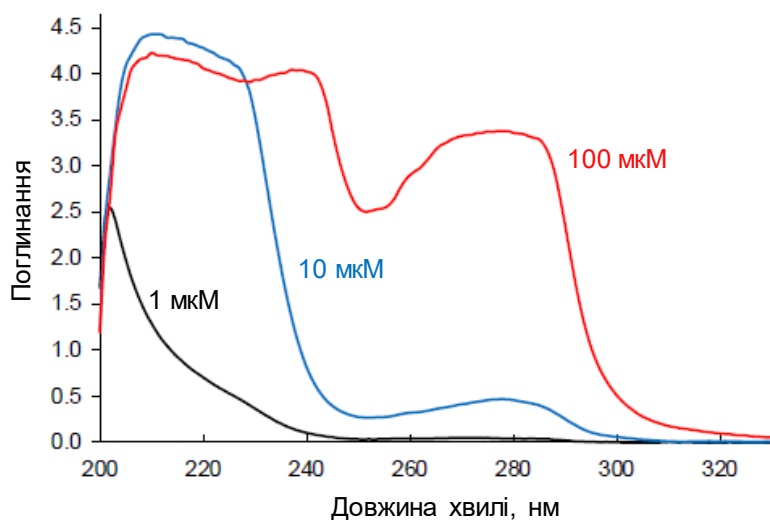
510. Нижче наведено спектри поглинання родаміну 6G та флуоресцеїну в етанолі (без додавання луку). Спектри нормовані на концентрацію так, що по вертикальній осі відкладено коефіцієнти поглинання. У вас є розчин суміші цих двох барвників в етанолі для якого поглинання на 480 нм рівне 0,25, а на 530 нм – 0,3 (1-см кювета). Оцініть концентрацію кожного з барвників у розчині та намалюйте приблизний спектр поглинання суміші.



511. При роботі з лактатдегідрогеназою (ЛДГ), яка каталізує перетворення лактату на піруват з відновленням NAD^+ до NADH , для оцінки її активності в

лабораторії вимірюють збільшення поглинання при 340 нм — довжині хвилі, на якій поглинає NADH. Аліна підготувала реакційний розчин, у якому концентрація NAD^+ становила 1 мМ, а лактату — 10 мМ. Вона додала 50 мкл ферментного розчину до 950 мкл реакційної суміші у 1-см кварцову кювету й спостерігала стабільне зростання поглинання при 340 нм на 0,122 одиниці на хвилину. Її одногрупник Орест вирішив зекономити фермент і додав лише 10 мкл у таку ж реакційну систему та отримав зростання поглинання 0,027 одиниці на хвилину. На скільки відрізняються результати Ореста та Аліни?

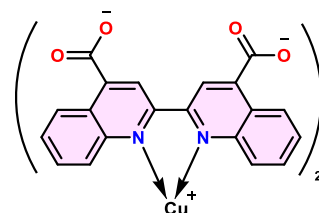
512. На рисунку наведені спектри поглинання протеїну BSA виміряні в 1-см кюветі в різних концентраціях на дуже якісному спектрофотометрі. Поясніть, в чому може бути причина відмінності у формі спектрів? Відомо, що BSA містить 3 триптофани й 21 тирозин. Який з цих спектрів найкраще узгоджується з теоретичним значенням поглинання на 280 нм?



Складніші завдання

513. Барвник FLT має максимум поглинання на 590 нм ($\epsilon = 98000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в етанолі). У вас є концентрований розчин барвника (біля 10 мг/мл), спектрофотометр, що міряє поглинання в діапазоні 0..2,2 з точністю $\pm 0,002$, кювети 1 см ($V = 1000\text{-}2000$ мкл) та 2 мм ($V = 200\text{-}400$ мкл), етанол, піпетки 1-10 мкл ($\pm 0,2$ мкл), 10-100 мкл (± 1 мкл), 100-1000 мкл (± 3 мкл), епандорфи на 1,7 мл. Вам потрібно максимально точно виміряти концентрацію розчину. Як ви це зробите і якої точності ви зможете досягнути?

514. Колориметричний метод визначення протеїну в тесті з біцинхоніною кислотою (2,2'-біхінолін-4,4'-дикарбоною кислотою) заснований на відновленні іонів міді ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) при взаємодії із залишками цистеїну, триптофану, тирозину в лужному середовищі та утворення забарвленого комплексу Cu^+ . Студент та аспірант використовували цей метод для визначення вмісту протеїну в невідомому зразку тканини



з хвоста миші, проте отримали доволі різні результати. Студент використав для побудови калібрувального графіка очищений BSA, а аспірант – звичайний желатин для кулінарії. Згідно чиїх результатів вміст білків у зразку був вищим? Чиї результати були на вашу думку ближчі до реального вмісту й чому? Який додатковий спектрофотометричний експеримент міг би допомогти визначити концентрацію більш точно?

515. Шляхом комп'ютерного моделювання ви встановили, що пептид GAVAYEGAVA має великі шанси бути ефективним інгібітором певної протеази. Щоб це перевірити ви замовили синтез пептиду у фірми щоб провести прикладні тести й виміряти IC_{50} . Через місяць ви отримали замовлення – 14 мг білого снігоподібного порошку, що зазвичай є ознакою доволі чистого пептиду. Проте ви не знаєте чи цей пептид не містить домішок неорганічних солей та чи він у вільній формі чи є сіллю тож не хочете покладатися на масу при визначенні концентрації розчину. Ви розчинили 5 мг отриманого пептиду у 1000 мкл 100 мМ фосфатного буферу й визначили його концентрацію двома методами: (1) по поглинанню тирозину на 280 нм., та (2) по Бредфорду, використовуючи BSA як стандарт і отримали такі результати:

(1) поглинання тирозину: до 1-см кювети з 1000 мкл буферу додали 20 мкл приготованого розчину й отримали поглинання 0,135. При додаванні ще 20 мкл поглинання зросло майже лінійно, до 0,271. На основі цих даних оцініть чистоту отриманого пептиду й приблизну його концентрацію (в мкМ) в розчині, який ви приготували. Чим могли б бути викликані розбіжності даних отриманих двома методами й якому з них ви довіряєте більше?

(2) метод Бредфорда

Стандарт (10 мг/мл BSA)	0	2	4	8	16	Зразок	10	20
A595	0,001	0,020	0,041	0,082	0,160		0,020	0,041

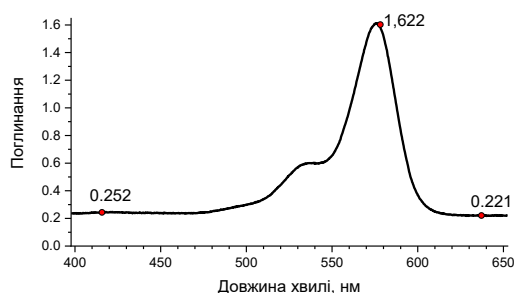
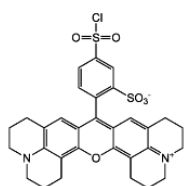
516. Спектрофотометр вимірює поглинання з точністю $\pm 0,002$, а точність додавання розчину піпеткою $\pm 0,3$ мкл. Студент додав 3 мкл концентрованого розчину протеїну ($\epsilon_{280} = 25900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) в кювету (1 мл, 1 см) й отримав поглинання 0,033, а аспірант – додав 10 мкл цього ж розчину і отримав поглинання 0,115. Які значення концентрації і з якою точністю виміряв концентрацію кожен з них?

517. Студент вирішив виміряти спектри поглинання протеїну, міченого родаміном, в ось такій кюветі з внутрішніми розмірами 4×10 мм використовуючи 800 мкл розчину та оптичний шлях 1 см. Проте, він отримав дуже несподівані для себе результати залежності поглинання на максимумі від концентрації. Поясніть, що пішло не так. Чи можна хоча б приблизно оцінити концентрацію міченого протеїну, в розчині, який додавали в кювету?

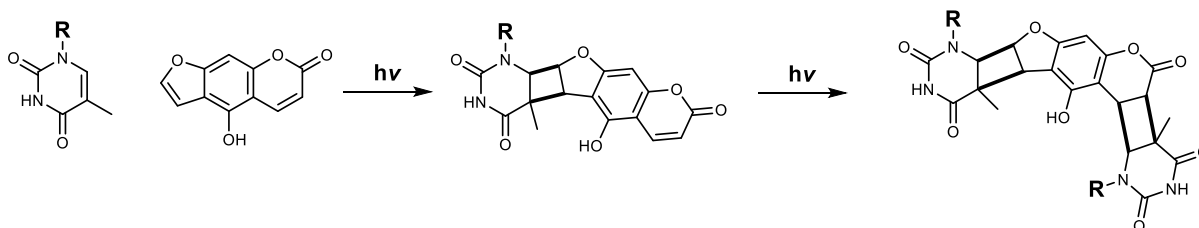


Доданий об'єм, мкл	1	2	5	10	20	50
A_{525}	0,054	0,106	0,238	0,386	0,498	0,523

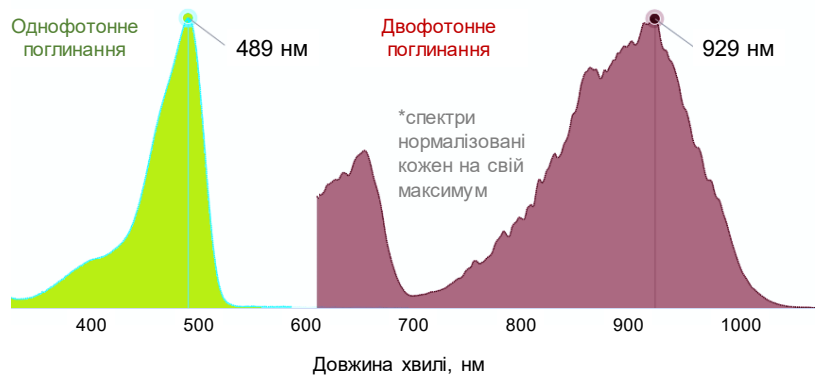
518. Студент хотів виміряти концентрацію дорогого розчину протеїну міченого похідною сульфорадаміну 101. Він не мав доступу до п'єдестального спектрофотометра, тому вирішив скористатися мікрокюветою на 50 мкл (оптичний шлях 3×3 мм). Спочатку він налив розчин в кювету виміряв спектр. Оскільки іншої такої кювети в нього не було, то базову лінію записав по повітрю. Спектр виявився зміщеним уверх. В чому була помилка? Чи можна по таких даних порахувати концентрацію і якщо можна, то яка вона буде?



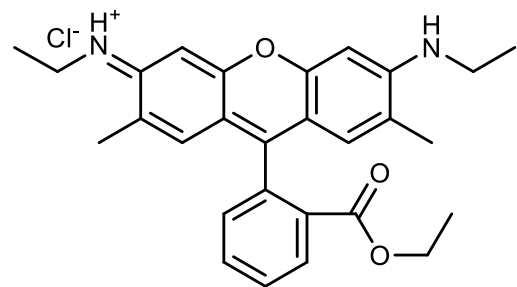
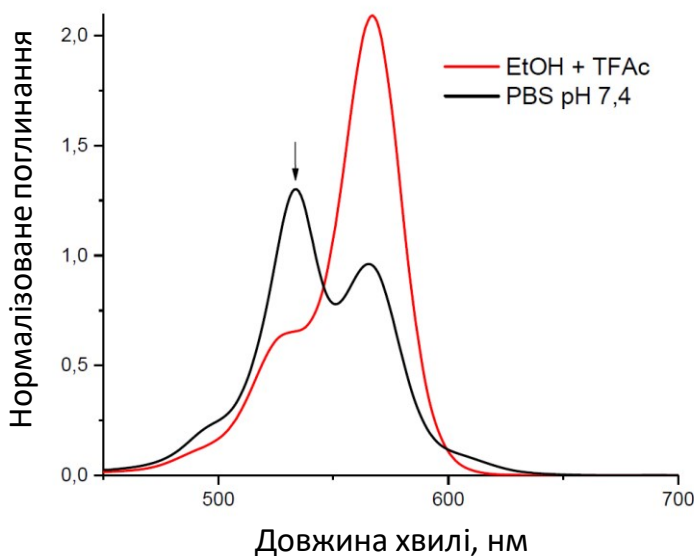
519. Дотик до листа борщівника, а особливо попадання його соку на шкіру, може викликати опік. Перший час людина не має жодних неприємних відчуттів. Але вже під час нетривалого і несильного опромінення сонцем ділянки шкіри, забрудненої соком, проявляються опіки, які в ясний сонячний день можуть досягати другого ступеня (пухирі наповнені рідиною). Така дія пов'язана з вмістом фуранокумаринів – речовин, що здатні зшивати дві тимінові основи при дії світла, як показано нижче на прикладі бергаптолу. Виділіть в кожній з наведених нижче молекул π -спряжену систему та, базуючись на структурі, оцініть приблизну довжину хвилі поглинання. Поясніть, чому борщівник безпечніше скошувати під час дощу.



520. Тут наведено спектри поглинання протеїну EGFP при класичному та двофотонному збудженні згідно даних бази fpbase.org. Поясніть, що може бути причиною того, що довжини хвиль максимумів поглинання відрізняються дещо менше, ніж вдвічі?



521. Через агрегацію спектри концентрованого розчину родаміну 6G в фосфатному буфері мають нетипову форму, яка сильно відрізняється від спектрів розведеного розчину барвника чи концентрованого розчину в підкисленому етанолі. Намалюйте схематично як змінюватиметься спектр поглинання цього барвника при розведенні. Які взаємодії електростатичні чи ліпофільні більш відповідальні за агрегацію в цьому випадку?



Родамін 6G

522. Якщо ліпід мічений барвником АТТО-488 (з максимумом поглинання на 488 нм) розчинити в суміші хлороформ-метанол 3:1 то розчин, які і очікувалось буде мати жовтувате забарвлення дуже схоже на розчин флуоресцеїну. Проте, якщо такий мічений ліпід розчинити в чистому хлороформі то забарвлення розчину буде червоніше й нагадуватиме дуже розведений розчин родаміну. Що може бути причиною збільшення довжини хвилі поглинання якщо відомо, що спектри вільного барвника в обох розчинниках практично ідентичні?

7.2. Флуоресценція

Пам'ятка:

- Квантовий вихід флуоресценції: відношення кількості фотонів, що випромінила молекула, до кількості поглинутих.
- Квантовий вихід флуоресценції та час життя збудженого стану не залежать від довжини хвилі збудження
- При збудженні молекула флуорофору може іноді може руйнуватися переходячи в не флуоресцентну молекулу. Це явище називають фотодеградація. Для комерційних флуорофорів воно трапляється приблизно раз на 100 000 (флуоресцеїн) – 1 000 000 (родамін) поглинутих фотонів. Для природних флуорофорів типу триптофану – набагато частіше. Фотодеградація за сталої інтенсивності світла зазвичай описується кінетикою першого порядку.
- Якщо дві молекули флуорофорів знаходяться достатньо близько одна від одної, а спектр емісії однієї з них (так званого "донора") перекривається з спектром поглинання іншої ("акцептора"), то при збудженні донора енергія переноситиметься на молекулу акцептора і спостерігатиметься його флуоресценція. Цей процес відбувається коли відстань між молекулами 2-10 нм. Його ймовірність сильно зменшується з відстанню (r) : $E = \left(1 - \frac{F_{DA}}{F_D}\right) = \frac{(r/R_0)^6}{1 + (r/R_0)^6}$, де R_0 (відстань 50% ефективності) називають Фьостерівським радіусом.
- Анізотропія флуоресценції $r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$

Обов'язковий рівень

523. Флуорофор поглинув 1 000 000 фотонів з довжиною хвилі 460 нм і випромінив за рахунок цього 567 000 фотонів з довжинами хвиль від 485 до 575 нм. Розрахуйте квантовий вихід флуоресценції цього флуорофору за даних умов.

524. Якій довжині хвилі відповідає хвильове число 19500 см^{-1} ?

525. Який зсув позиції максимуму емісії відповідає більшій зміні різниці енергії (в см^{-1}) $460 \rightarrow 480 \text{ нм}$ чи $320 \rightarrow 330 \text{ нм}$?

526. Студент працює на конфокальному мікроскопі використовуючи 488 нм лазер. Він зробив знімок клітини, що містила актин-mCherry й отримав середній рівень сигналу 888. Коли він зробив такий самий знімок вдруге не змінюючи

налаштувань середня інтенсивність склала 777. Чому вона зменшилась? Скільки ще знімків він зможе зробити поки середня інтенсивність не впаде нижче 300?

Приклад 1

Білок F містить два домени. Один з них було промічено Atto-488 а інший – Atto-565. Ефективність переносу енергії між цими барвниками у міченому білку становить 0,55. Оцініть відстань між точками мічення. Фьостерівський радіус для цієї пари барвників становить 6,4 нм.

Розв'язок: Скористаємось формулою залежності ефективності FRET від відстані: $E = \frac{(r/R_0)^6}{1+(r/R_0)^6}$ й розрахуємо r/R_0 .

$$0,55 = \frac{\left(\frac{r}{R_0}\right)^6}{1+\left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \Rightarrow 0,55 \left(1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6\right) = \left(\frac{r}{R_0}\right)^6 \Rightarrow \left(\frac{r}{R_0}\right)^6 = \frac{0,55}{1-0,55} \approx 1,22$$

$$\frac{r}{R_0} = (1,22)^{\frac{1}{6}} \approx 1,03$$

Потім перемножимо його на вказане значення Фьостерівського радіуса для даної пари барвників щоб отримати остаточну відповідь.

$$r = 1,03R_0 \approx 6,6\text{нм}$$

Варто зазначити що це ідеалізований варіант, в реальності ж потрібно врахувати неточності пов'язані з довжиною лінкерів до міток.

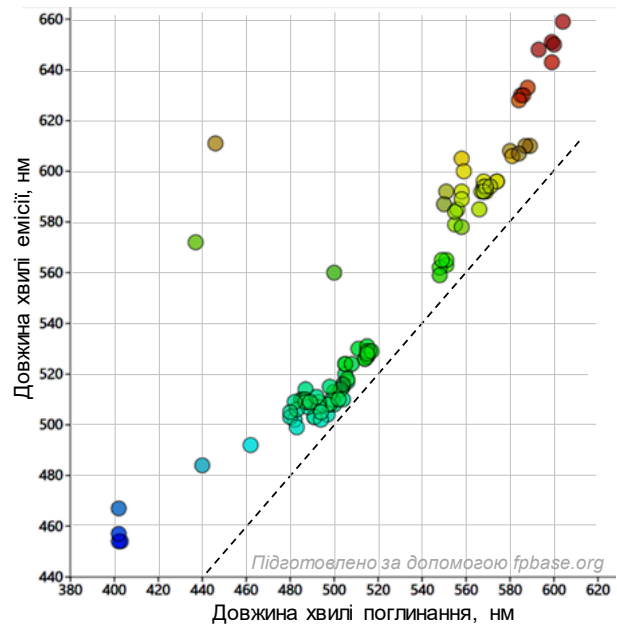
527. Рівняння Ліпперта-Мантаги (Lippert-Mataga), яке дозволяє оцінити позицію максимуму емісії флуорофору в залежності від полярності розчинника має такий вигляд:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{2}{hc} (\mu_e - \mu_g)^2 a^{-3} \Delta f + const, \quad \text{де} \quad \Delta f = f(\varepsilon) - f(n^2) = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

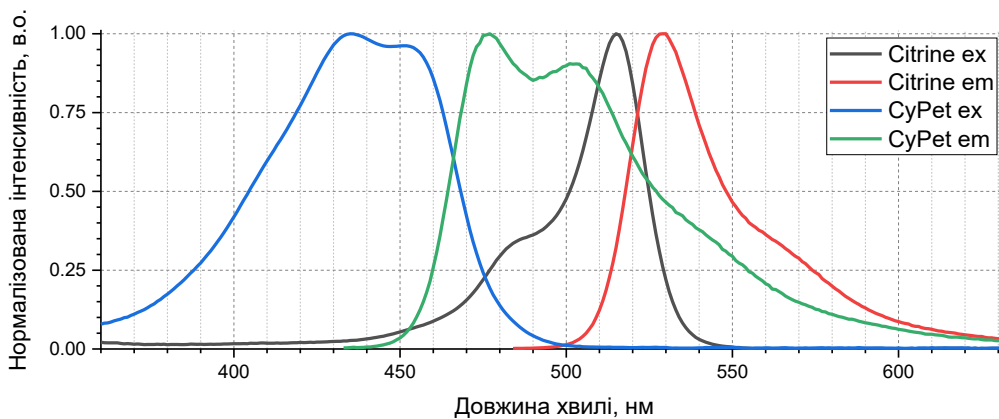
Поясніть, що означають позначення.

528. Протеїн TEST містить один залишок триптофану. Як зміниться анізотропія флуоресценції цього триптофану якщо а) до розчину додати гасник флуоресценції, б) до розчину додати ДНК, яке взаємодіє з протеїном?

529. На графіку наведено довжини хвиль поглинання та емісії флуоресцентних протеїнів, що зручні для мікроскопії (зокрема мають квантовим виходом флуоресценції більше 17% та є мономерами). Оцініть типові значення Стоксового зсуву флуоресцентних протеїнів у нм та см^{-1} . Як залежать ці величини від довжини хвилі поглинання? Що показує чорна штрихова лінія?



530. Нижче наведено нормалізовані спектри поглинання та емісії двох флуоресцентних протеїнів, CyPet та Citrine. Проаналізуйте їх та запишіть для кожного з протеїнів: максимум поглинання, максимум емісії, стоксів зсув, ширину лінії на половині максимальної інтенсивності (FWHM). Якщо брати до уваги тільки ці характеристики, то який з цих двох флуоресцентних протеїнів був би більш зручний для багатоканальної мікроскопії клітин?



Середній рівень

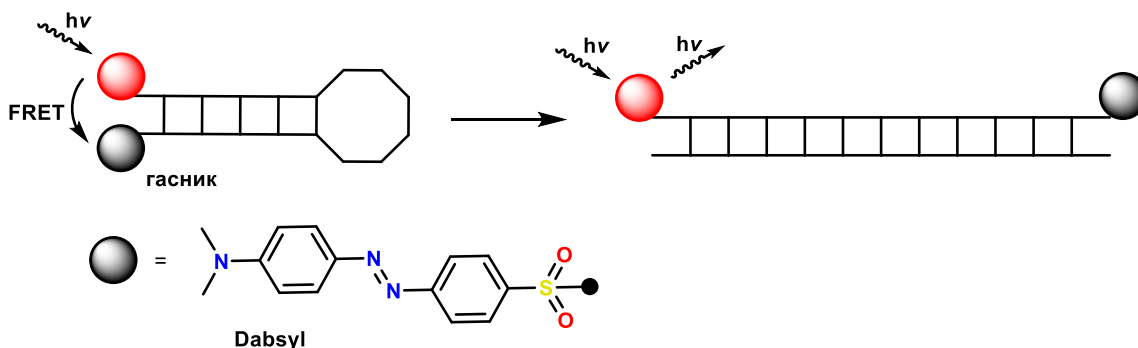
531. Білок мічений Cy3 та Cy5 зустрічається в двох конформаціях з відстанню між барвниками 2 нм (20%) та 5 нм (80%). Фьостерівська відстань для пари Cy3-Cy5 становить $R_0 = 5,2$ нм. Обчисліть а) середню відстань між барвниками, б) ефективність FRET для кожного конформера, в) середню ефективність FRET по популяції. Яка середня відстань була б визначена з експерименту FRET, якщо

знехтувати неоднорідністю популяції? Які експерименти могли б вказати дослідникам на наявність двох популяцій?

532. Час життя збудженого стану карбоксифлуоресцеїну прикріпленого до 3' кінця РНК-ДНК дуплексу становить $\tau_D = 5$ нс. Коли на 5' кінці того ж дуплексу додатково присутній барвник Atto-565 то, час життя збудженого стану карбоксифлуоресцеїну зменшується до $\tau_{DA} = 3$ нс. Яка ефективність передачі енергії, та відстань між донором і акцептором? Вважайте, що дуплекс перебуває в одній конформації (видовжена пряма), а $R_0 = 5,5$ нм. На основі цих даних оцініть довжину дуплексу в парах основ враховуючи, що барвники прикріплені гнучкими лінкерами довжиною 0,4 нм кожен.

533. Квантовий вихід флуоресценції сольватохромного барвника Me3HC у етанолі становить 0,52, а час життя збудженого стану – 2,33 нс. Оцініть, який максимальний час життя збудженого стану може мати цей барвник в клітинній мембрані. Вважайте, що барвник має одну популяцію й просту фотофізику (один час життя збудженого стану) у кожному з середовищ.

534. "Молекулярний маяк" (molecular beacon) – олігонуклеотид в конформації шпильки на одному з якого розміщено флуорофор (скажімо тетраметилродамін), а на іншому – гасник флуоресценції (скажімо дабсил). У вільному стані така практично молекула не флуоресціює через внутрішньомолекулярне гасіння. При зв'язуванні ж з комплементарною послідовністю ДНК чи РНК вона видовжується й може спостерігатися флуоресценція. Фьостерівський радіус для пари Дабсил-тетраметилродамін становить приблизно 2,8 нм, а для пари Дабсил-Alexa Fluor 350 – близько 5,0 нм. Одна пара нуклеотидів відповідає довжині спіралі 0,34 нм. Оцініть мінімальну довжину шпильки молекулярного барвника (в нуклеотидах) при використанні кожної з цих пар барвників яка забезпечить принаймні 80% максимальної яскравості флуорофору при розгортанні.



535. Декануклеотид TGTGTGTGTG-Fluorescein у буфері має анізотропію флуоресценції 0,071. При повному зв'язуванні з протеїном NCp7 ця величина

зростає до 0,163. Якому відсотку зв'язаного протеїну буде відповідати значення 0,123? Оцініть похибку оцінки відсотка зв'язаного протеїну якщо пристрій, на якому вимірювалась анізотропія флуоресценції, дає похибку $\pm 0,002$.

536. Як вплине невеличке світлорозсіювання розчином на анізотропію флуоресценції?

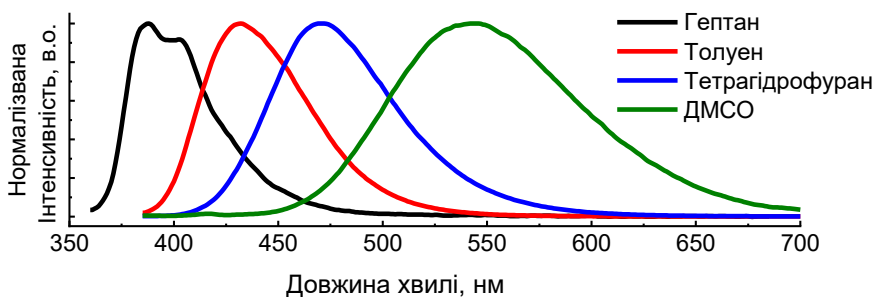
537. Анізотропія флуоресценції 10 мкМ пептиду KLKVLKLVK міченого по N-кінцю флуоресцеїном в буфері становить 0,07. Яка буде анізотропія флуоресценції 7 мкМ розчину цього ж пептиду в таких умовах?

Складніші завдання

538. При зв'язуванні з субстратом ензим змінює конформацію так, що відстань між Trp77 та Lys125 зростає від 1,2 нм до 1,9 нм. Яку зміну сигналу можна буде спостерігати якщо промітити Lys125 карбоксифлуоресцеїном і моніторити взаємодію по ефективності FRET при збудженні 280 нм? Які можуть виникнути проблеми при вивченні активності ензиму таким способом?

539. Сольватохромний флуорофор типу Донор- π -система-Акцептор має максимум емісії 420 нм в гексані й 520 нм в ДМСО. Де приблизно буде максимум емісії такого флуорофору в етилацетаті, толуені та ацетонітрилі ?

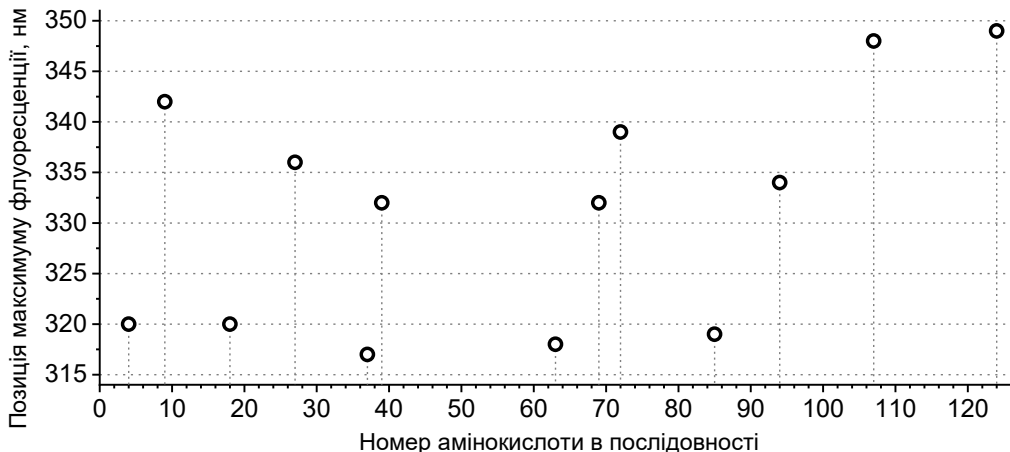
540. Нижче наведено спектри емісії сольватохромного барвника в кількох розчинниках. Побудуйте приблизну залежність частоти емісії (см^{-1}) від полярності середовища (Et30) та на основі цих даних оцініть полярність мембран утворених з POPC, якщо максимум емісії цього барвника в них близько 450 нм.



541. Запропонуйте експеримент по визначенню коефіцієнту дифузії родаміну. Оцініть точність, яку ви зможете досягти при вимірах цим методом. Чи зможете ви таким способом розрізнити розчин міченого родаміном білка (15 кДа) і вільного родаміну?

542. Поясніть, чому спектр емісії сольватохромних барвників в гептані більш структурований, ніж в толуені чи ДМСО. Поясніть, чому півширина спектру емісії більшості сольватохромних барвників зростає з полярністю розчинника.

543. Дослідники вивчали взаємодію невеликого 140-амінокислотного протеїну з мембраною. Для цього вони синтезували мутанти протеїну, що містили триптофан в різних позиціях з записали спектри флуоресценції таких протеїнів у вільному стані та після зв'язування з мембраною. У вільному протеїні триптофан у всіх позиціях мав максимум емісії близько 350 нм. Проте, після зв'язування з мембраною спостерігалась серйозна відмінність між позиціями обумовлена різною глибиною занурення у мембрану як показано нижче. Що ви можете сказати про орієнтацію протеїну на мембрані на основі таких даних якщо відомо, що протеїн перебуває в переважно α -спіральній конформації?

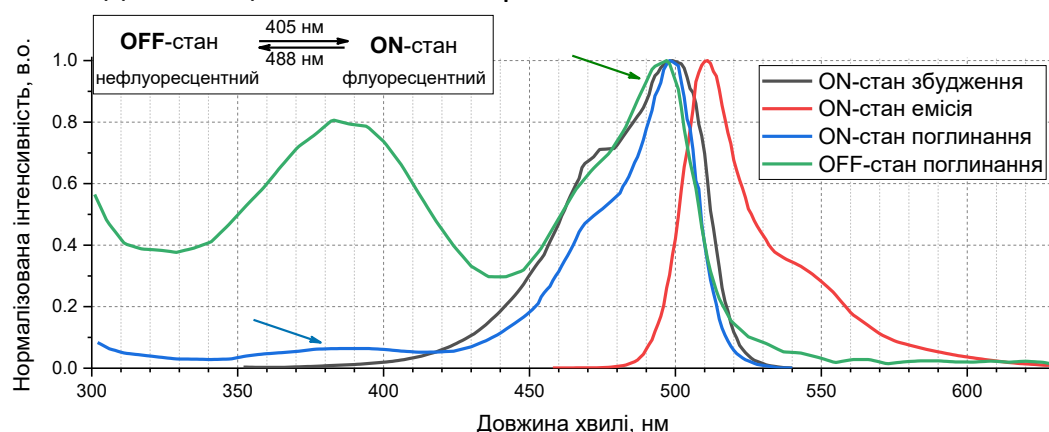


544. 440 мкл 10 нМ розчину олігонуклеотиду X міченого флуоресцеїном титрували 1 мМ розчином протеїну Y спостерігаючи за анізотропією флуоресценції. Оцініть стехіометрію та константу зв'язування.

Додано сумарно, мкл	0	5	10	14	20	30	40	50	60
Анізотропія	0,076	0,088	0,103	0,117	0,124	0,137	0,142	0,14	0,144

545. Одні дослідники розробили флуоресцентний протеїн Skylan-NS (скорочення від "sky lantern for nonlinear structured illumination"), який здатен переходити між нефлуоресцентним станом (OFF-стан) та флуоресцентним (ON-стан) при опроміненні світлом на 405 нм та назад при опроміненні на 488 нм. Такий барвник протеїн можна використовувати для флуоресцентної мікроскопії з надроздільною здатністю. Дослідники опублікували спектри збудження та емісії ON-стану (флуоресценція) та спектри поглинання обох станів. Проте, є сумніви, що спектри поглинання справді є спектрами саме чистих ON- та OFF-форм через наявність піків позначених синьою та зеленою стрілками. Зробіть припущення

про походження цих піків та спектри поглинання чого могли навести дослідники.



546. Нуклеокапсидний протеїн вірусу HIV-1, NCp7, що містить два цинкових пальці, взаємодіє з полінуклотидами (ДНК та РНК) та має вищу спорідненість до одониткових нуклеїнових кислот, ніж до двониткових. За рахунок цього NCp7 здатен стабілізувати одониткові ділянки та сприяти розплетенню вторинних структур, скажімо шпильки вірусного геному. Щоб вивчити таку взаємодію 50 нМ розчин 55-нуклеотидної шпильки TAR (transactivation response element) геному HIV-1 міченої флуоресцеїном на 5' кінці відтитрували розчином NCp7. Відсоток зв'язаного TAR оцінювали по зміні анізотропії флуоресценції, дані наведено в таблиці. Оцініть стехіометрію зв'язування.

[NCp7], нМ	0	40	80	160	320	500	700	1000
Частка зв'язаного TAR	0	0,13	0,25	0,49	0,82	0,91	0,93	0,97

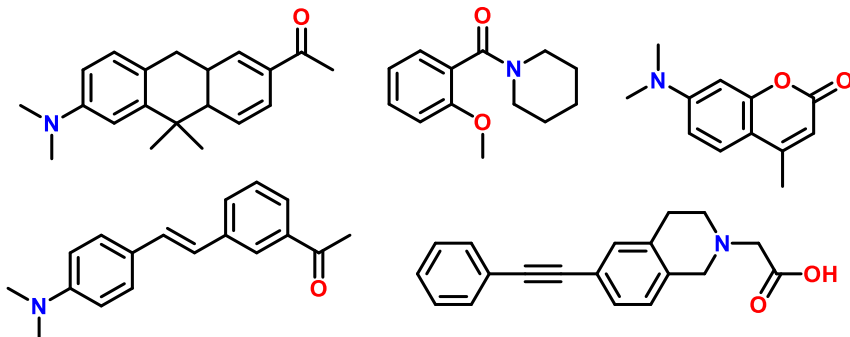
Література до розділу

- Lakowicz, J.R., **Principles of fluorescence spectroscopy**, Kluwer Academic/Plenum, New York, 1999
- Пивоваренко В.Г., **Абсорбційна та флуоресцентна спектроскопія органічних сполук**; К.: ВПЦ «Київський університет», 2023 // **розділи 1-3**
- Demchenko, A. P., **Introduction to Fluorescence Sensing**, Springer, 2020, ISBN 978-3-030-60155-3 // **розділи 2-5**

7.3. Флуорофори та хромофори

Обов'язковий рівень

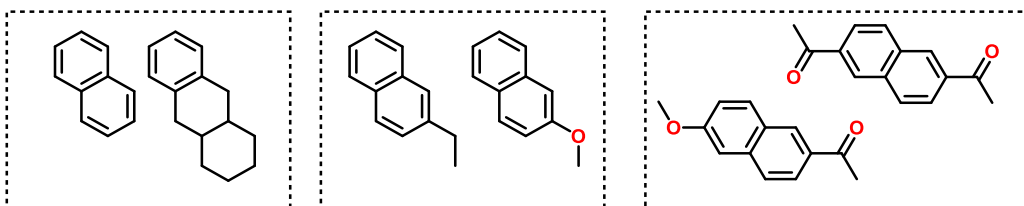
547. В кожній з наведених сполук виділіть спряжену π -систему та розмістіть їх в порядку зростання довжини хвилі максимуму поглинання світла.



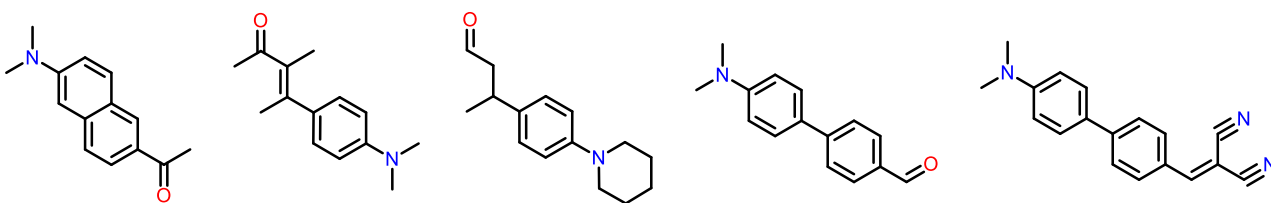
548. Наведіть формулу будь-якого сольватохромного флуорофору, що поглинає в регіоні 280 нм.

549. Наведіть формулу сольватохромного барвника, що поглинає в регіоні 400 нм.

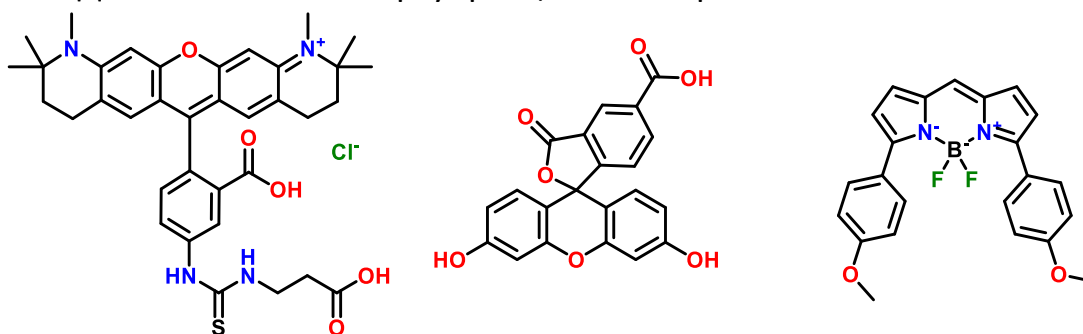
550. В кожній з пар сполук оберіть ту, яка поглинатиме світло з більшою довжиною хвилі, й поясніть в 2-4 слова причину вашого рішення.



551. Розмістіть наведені флуорофори в порядку зростання сольватохромності (різниці дипольного моменту у збудженому й основному стані).

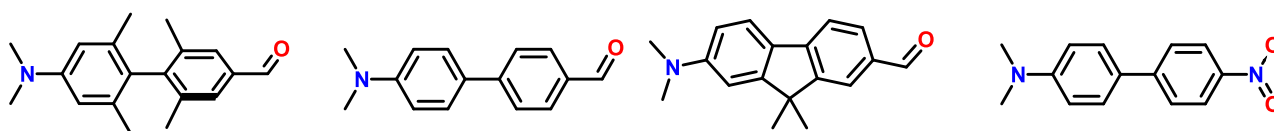


552. До якого з сімейств флуоресцентних барвників належить кожна з цих сполук

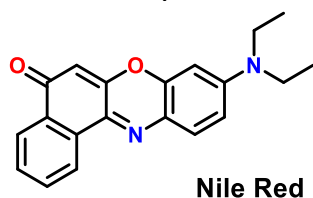


Середній рівень

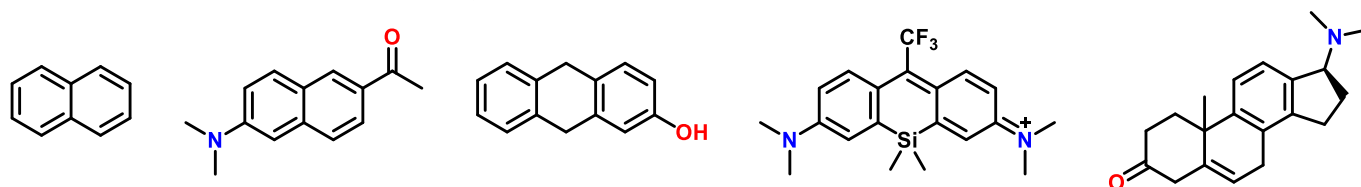
553. Всі ці чотири сполуки майже не флуоресціюють у воді. Проте деякі з них можуть мати гарну флуоресценцію при вбудовуванні в мембрани. Поясніть причини низького квантового виходу флуоресценції у воді кожної з сполук (їх може бути кілька) та те, які з сполук і чому флуоресціюватимуть у мембранах.



554. Тут зображено структуру сольватохромного барвника Нільський червоний (Nile Red), який поглинає близько 550 нм. Що в його структурі є спільним з родаміном та флуоресцеїном і чому на відміну від цих барвників він є сольватохромним?

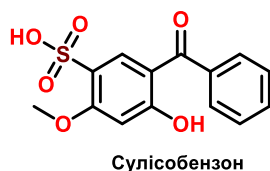
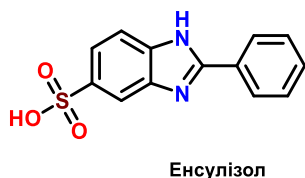
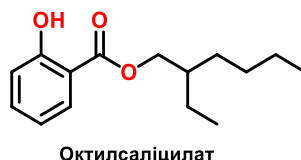
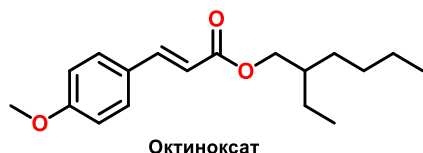


555. Розмістіть наступні молекули в порядку зростання довжини хвилі поглинання світла на максимумі.

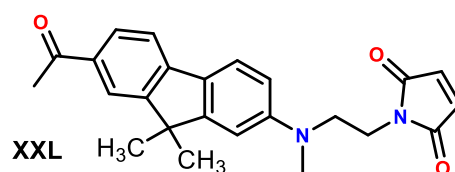


556. Нижче наведено речовини, які часто входять до складу сонцезахисних кремів. На основі їх структури оцініть позицію максимумів поглинання та напишіть які з них захищатимуть і від UVA (315-400 нм), і від UVB (280-315 нм), а

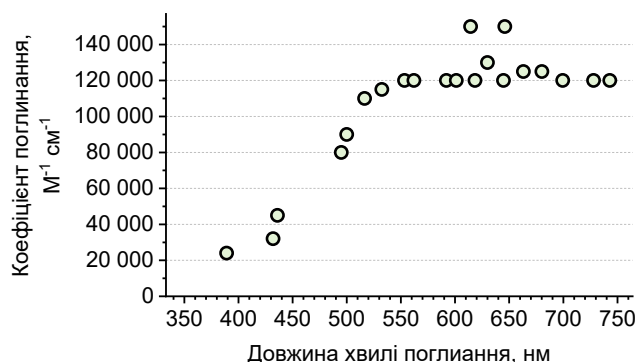
які – лише від UVB чи UVA.



557. Тут зображено формулу сольватохромної мітки XXL, яка є подовженим варіантом продану і може використовуватися для мічення цистеїнів протеїнів. Покажіть на формулі спряжену π-систему. Запропонуйте пояснення для чого в структуру було введено виділені метильні групи.



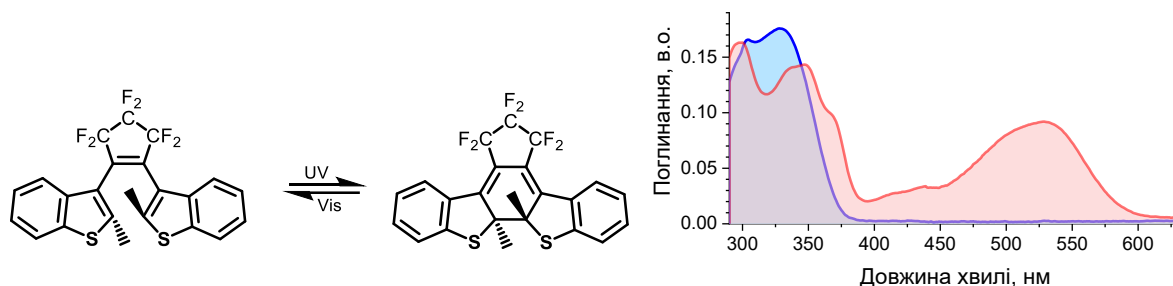
558. На графіку наведено залежність молярного коефіцієнту поглинання комерційних барвників для флуоресцентної мікроскопії сімейства Atto від довжини хвилі максимуму поглинання. Чим може бути обумовлена така залежність?



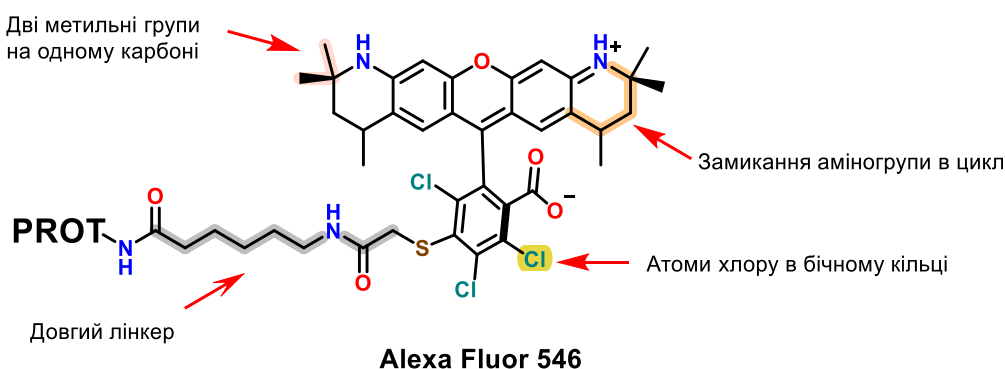
Складніші завдання

559. Флуоресцентний білок GFP містить природний флуорофор всередині β-діжки з 11 β-смужок. Білок можна розділити на дві частини — GFP₁₋₁₀ (основний фрагмент) та GFP₁₁ (малий пептид, ≈16 амінокислот). Ці фрагменти окремо не флуоресціюють, але коли вони зближуються в просторі, то самозбираються в замкнену β-діжку, яка захищає флуорофор від води, що гасить флуоресценцію. Це явище можна використовувати для вивчення взаємодій протеїнів в клітинах. В одній лабораторії потрібно вивчити чи утворюють комплекс два цитозольні білки А та В у клітині. Вчені сконструювали дві експресійні плазміді: Плазміді 1: А–GFP₁₋₁₀, Плазміді 2: В–GFP₁₁. Після трансфекції клітин *HeLa* цими плазмідіами провели флуоресцентну мікроскопію та побачили яскраву зелено-флуоресценцію в цитоплазмі. Який контрольний експеримент потрібно провести, щоб переконатися, що флуоресценція зумовлена саме взаємодією А та В, а не випадковою дифузією фрагментів GFP?

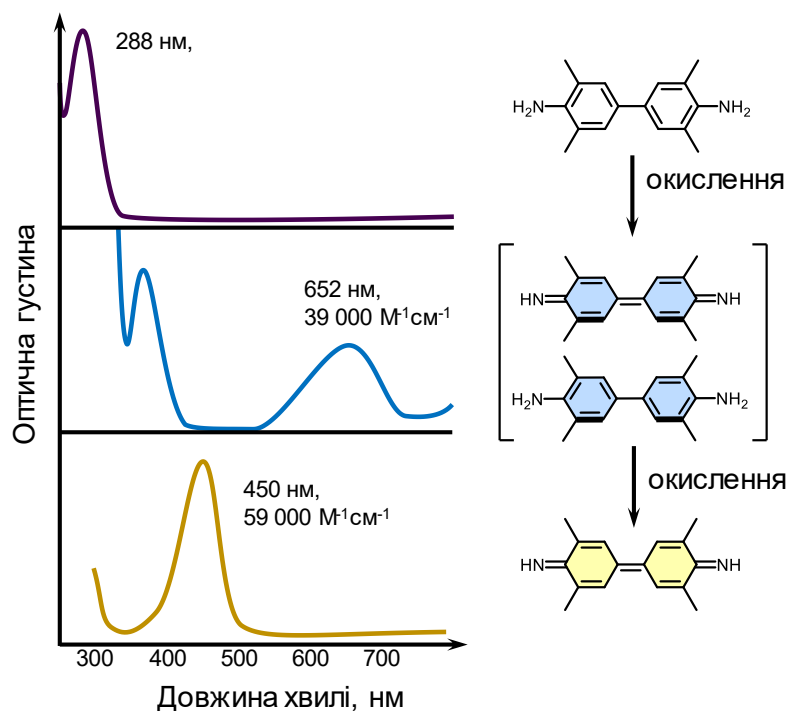
560. Деякі барвники здатні при опроміненні світлом змінювати свою структуру та переходити в форми з іншими спектральними властивостями. Таку властивість називають фотохромізмом або фотоперемиканням. Нижче наведено реакцію, яка відбувається при опроміненні одного з фотохромних барвників класу диарилетенів та спектри поглинання двох його форм. Який зі спектрів відповідає якій з форм? На яких довжинах хвиль потрібно опромінити кожен з сполук для досягнення фотоперемикання?



561. Нижче наведено структуру комерційного флуоресцентного барвника Alexa Fluor 546, який продається по ціні приблизно 500 Євро за міліграм. Він є аналогом в тисячі разів дешевшого флуорофора родаміну проте має кілька важливих модифікацій, які ускладнюють синтез, але покращують його фотофізичні властивості. Яка на вашу думку роль кожної з виділених модифікацій?

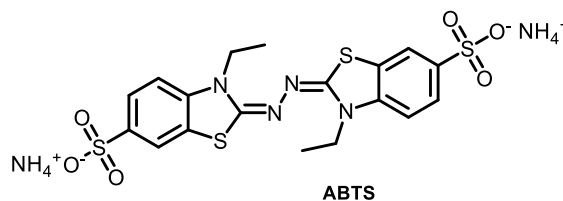


562. Тетраметилбензидин (ТМВ) часто застосовується в імуноферментному аналізі (ІФА, ELISA). В присутності пероксидази хрому (HRP) він окиснюється пероксидом водню в синій продукт, що є зручним для кількісного визначення активності пероксидази та, відповідно, вмісту мічених нею антитіл. При нормальному перебігу аналізу утворюється синій продукт, проте сильне окислення призводить до пожовтіння розчину. Нижче



наведено схематичні спектри та формули сполук задіяних в процесі. Поясніть, чому продукт одноелектронного окислення має більш довгохвильове поглинання ніж фінальний продукт окислення - бісдиімід.

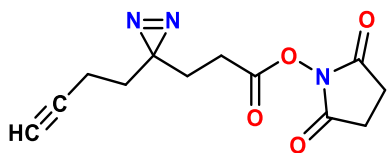
563. Для вимірювання загальної антиоксидантної здатності речовини часто застосовують барвник ABTS. Спочатку вихідний барвник окислюють зручним окисником (скажімо персульфатом амонію) до катіон-радикалу, який інтенсивно поглинає світло на 734 нм. При додаванні антиоксидантів цей катіон-радикал відновлюється в безбарвну сполуку, що і є основою для їх кількісного визначення. Намалюйте структуру катіон-радикалу ABTS, виділіть його спряжену систему та поясніть, чому він, на відміну від безбарвної відновленої форми, має довгохвильове поглинання.



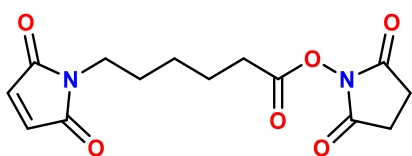
7.4. Мічення, біокон'югація, хімічна біологія

Обов'язковий рівень

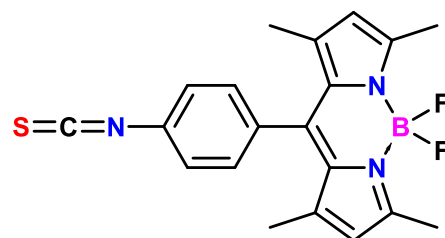
564. Ця сполука містить три функціональні групи й застосовується при вивченні взаємодій протеїнів. Поясніть як. Яка з груп використовується для початкового ковалентного мічення по аміногрупах?



565. Як така сполука буде реагувати з цистеїнами протеїнів? В яких умовах і з чим реагуватиме інша група?



566. Одна з українських компаній нещодавно розпочала випускати такий барвник з сімейства BODIPY. Який на вашу думку найпростіший спосіб приєднати його до протеїну?

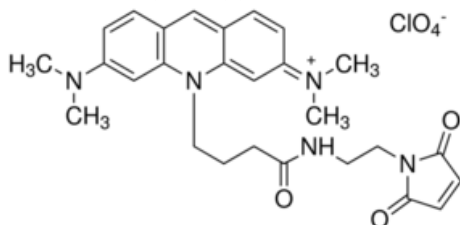


567. Ви маєте 50 мкл 2 мМ розчину AlexaFluor546-малеїміду. Скільки його потрібно додати для мічення 200 мкл 234 мкМ розчину моноцистеїнового мутанта протеїну X щоб отримати двократний надлишок мітки?

Середній рівень

568. Пептид STEPHANYKSCHEMISTRY обробили спочатку надлишком малеїмідної похідної родаміну, потім – надлишком флуоресцеїн-ізотіоціанату. Намалюйте схематично продукт який ви б очікували.

569. Це структура Atto 495. Де в ній малеїмід і для чого він там?



Приклад 1

До 100 мкл 100 мкМ протеїну X, що містить 1 цистеїн додали 10 мкл 2,3 мМ Atto488-малеїмід, інкубували 2 години. Потім барвник відділили пропусканням через буферобмінну колонку (size exclusion) при чому розчин протеїну розвівся до 180 мкл. Яка концентрація міченого протеїну очікується в утвореному розчині?

Визначаєм, яка речовина в надлишку:

Протеїн $100 \text{ мкл} \cdot 100 \text{ мкМ} = 10^{-8} \text{ моль}$

Барвник $10 \text{ мкл} \cdot 2300 \text{ мкМ} = 2.3 \cdot 10^{-8} \text{ моль}$

Барвник в надлишку, отже протеїн промітиться весь.

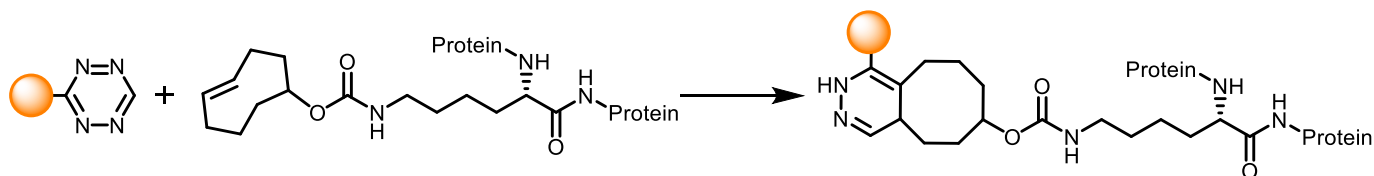
Концентрація впаде тільки через розведення

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$C_2 = 100 \cdot 100 / 180 \approx 55,6 \text{ мкМ}$$

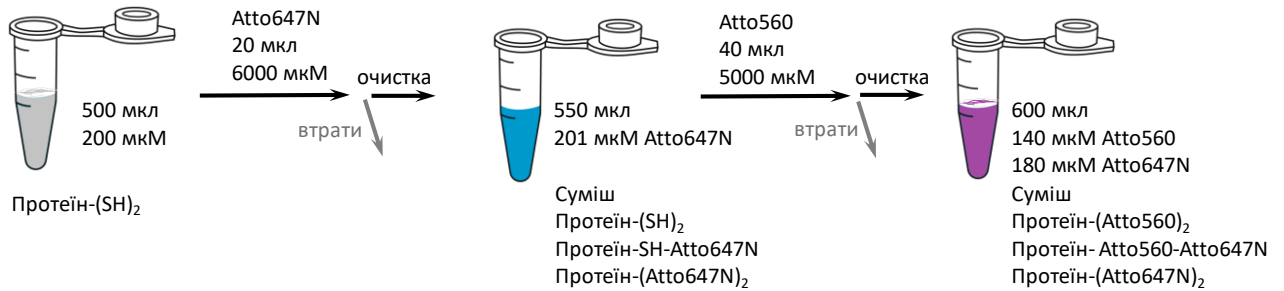
Складніші завдання

570. Реакції тетразинів з трансциклооктенами (TCO–Tetrazine) є однією з найшвидших біоортогональних реакцій (k до $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$). Нижче наведено приклад мічення протеїну тетразиною похідною барвника по неприродній амінокислоті, яка є похідним лізину. Як практично можна було б здійснити такі перетворення в клітині?

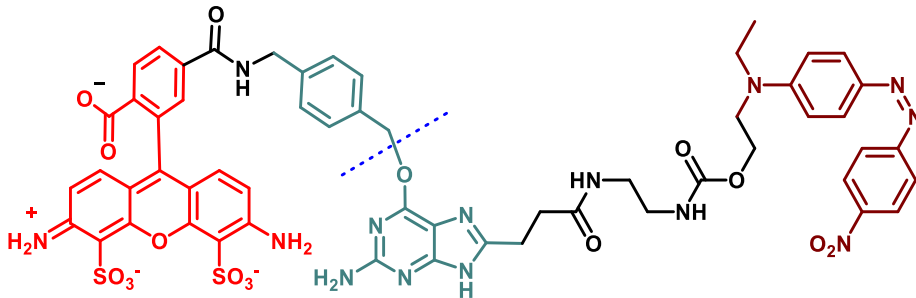


571. Для вивчення зміни конформації 300-амінокислотного протеїну Homc1 шляхом FRET експерименту зручно використати протеїн з двома різними мітками, Atto560 (донор) та Atto647N (акцептор) на N- та C-кінцевих доменах. При цьому не важливо на якому з кінців яка мітка. Домішка протеїну, що містить тільки акцептор не буде заважати експерименті, бо майже не збуджуватиметься при опроміненні донора, а от фракція протеїну, в якій є тільки донор заважатиме досить сильно. Щоб приготувати такий протеїн аспірантка спочатку отримала мутант Homc1-A30C-S273C, що містить два вільних цистеїни, а потім промітила акцептором і донором. На першому етапі вона додала до 500 мкл 200 мкМ розчину протеїну 20 мкл 6 мМ розчину Atto647N-малеїмїду в ДМСО та проінкубувала півтори години. Після того як протеїн пропустили через маленьку буферобмінну колонку, щоб очистити від низькомолекулярних речовин отримали 570 мкл розчину з сумарною концентрацією мітки 201 мкМ. Наступним етапом було введення Atto560. Для цього до отриманого розчину

додали 40 мкл 5 мМ розчину Atto560-малеїмід й інкубували 2 години. Після відділення надлишку барвника на буферообмінній колонці отримали 600 мкл міченого протеїну, в якому концентрація Atto560 була 140 мкМ, а Atto647N – 180 мкМ. Оцініть, яка концентрація у фінальному розчині бажаного продукту (протеїну з двома різними мітками), протеїну з дома акцепторами та з двома донорами. Як потрібно змінити умови експерименту, щоб отримати більше відношення кількості бажаного продукту до протеїну з двома донорами? Всі етапи мічення проводили з додаванням ТСЕР, який відновлював дисульфідні зв'язки, але майже не заважав реакції малеїмідів.



572. Нижче наведено структуру флуорогенної мітки для мічення по SNAP тагу. Вона флуоресцює після зв'язування з протеїном, але не світиться у вільній формі – що сильно зменшує фонову флуоресценцію при міченні протеїнів у клітинах. Які функції фрагментів показаних кожним кольором? Що показує синя штрихова лінія?



7.5. Круговий дихроїзм (CD) та інфрачервона спектроскопія (IR)

573. Пептид STEPHANYKFRANKIVSKSAMPLEQWERTYIPASDFGHKLCVNMSAMPLE в 70% гексафторізопропанолі набуває α -спіральної конформації на 80-90%. Який сигнал на 222 нм ви очікуєте для нього в CD спектрі. (10 мкМ розчин, 2 мм кювета).

574. Вимірювання обертання площини поляризації світла довжиною хвилі 222 нм 1,1 мкМ розчином 225-амінокислотного протеїну X (25,5 кДа) дає $\theta_A = 1,25$ міліградуса (mdeg). Для 375-амінокислотного протеїну Y ця величина становить 2,36 міліградуса. Чи дозволяють ці дані встановити який з цих білків має більший вміст α -спіралі? Довжина кювети 0,1 см, похибка вимірювання концентрації протеїнів 5%, похибка вимірювання обертання (CD сигналу) – 8%. Оцініть приблизну кількість амінокислот в α -спіральній конформації в кожному з протеїнів.

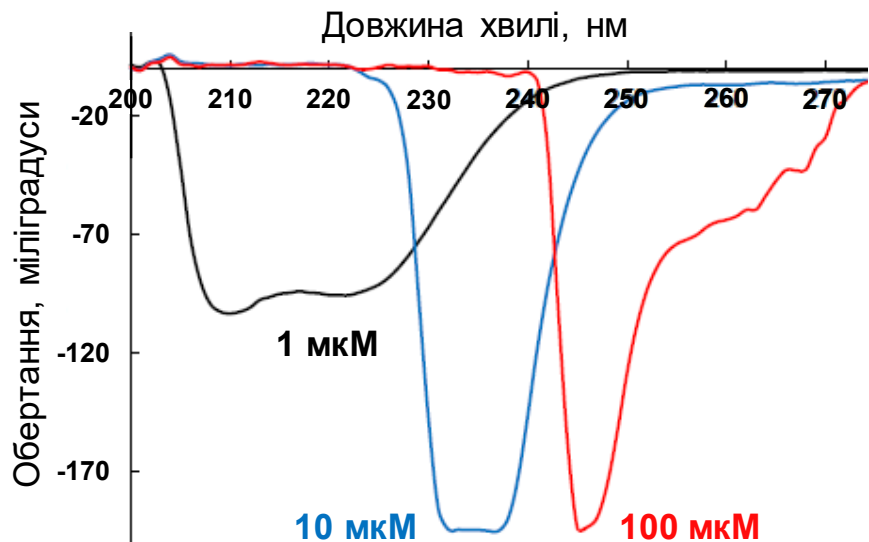
575. При нагріванні розчину протеїну EE відбувається його денатурація (розгортання). За даними CD-спектроскопії (сигнал на 222 нм) 50% денатурації відбувається при 56°C. Натомість сигнал флуоресценції єдиного триптофану у протеїні показує 50% перетворення (падіння сигналу при 322нм та зростання при 345нм) при 60°C. Чим це може бути обумовлено?

576. Студент проаналізував CD спектр пептиду IVANFRANKIVSKTARASSHEVCHENKIVSK й зробив висновок про його конформацію: α -спіраль 10%, β -складчастий шар 73%, неструктуровані фрагменти й повороти 17%. Керівник навіть не вчитуючись в послідовність й не дивлячись на спектри сказав, що висновки не вірні. Чому він був таким впевненим в цьому?

Складніші завдання

577. Під час лабораторної роботи студенти мали визначити, яка частина 607-амінокислотного протеїну BSA перебуває в α -спіральній конформації. Для цього їм було потрібно розчинити твердий протеїн у буфері, виміряти його концентрацію на спектрофотометрі, приготувати розчини зручних концентрацій, поміряти CD-спектри, розрахувати середню еліптичність на амінокислотний залишок (MRE, θ) на піку 222 нм та порівняти її з теоретичним значенням для чистого α -спірального протеїну $-40\ 000$ град·см²·дмоль⁻¹. Проте, неочікувано

виявилось, що форма спектру залежить від концентрації (див графік нижче). Очікувані піки на 208 та 222 нм були видимі тільки в 1 мкМ розчині. Чому в 10 мкМ розчині повністю зник сигнал на 208 нм і з'явився широкий пік на 230-240 нм? Якій речовині відповідає гострий пік на 247 нм у найбільш концентрованому розчині? Всі спектри міряли в 1-см кюветі спробуйте на основі цих даних оцінити, яка частина амінокислот BSA перебуває в α -спіральной конформації.



578. В кювету з 220 мкл буферу додали 10 мкл 120 мкМ розчину пептиду X. Після цього утворений розчин відтитрували 1 мМ розчином ліпосом DOPG в тому ж буфері (1 мМ) записуючи спектри CD через 120 секунд після кожного додавання. В таблиці наведено сигнал на трьох різних довжинах хвиль. Оцініть константу зв'язування та стехіометрію взаємодії.

Додано сумарно, мкл	0	2	5	9	14	20	27	35
l221, mdeg	-0,09	-0,78	-1,77	-2,47	-3,19	-3,48	-3,67	-3,90
l223, mdeg	-0,05	-0,74	-1,74	-2,45	-3,20	-3,50	-3,69	-3,96
l252, mdeg	0,11	0,10	0,06	0,05	-0,03	-0,05	-0,05	-0,14

7.6. Мас-спектроскопія (MS)

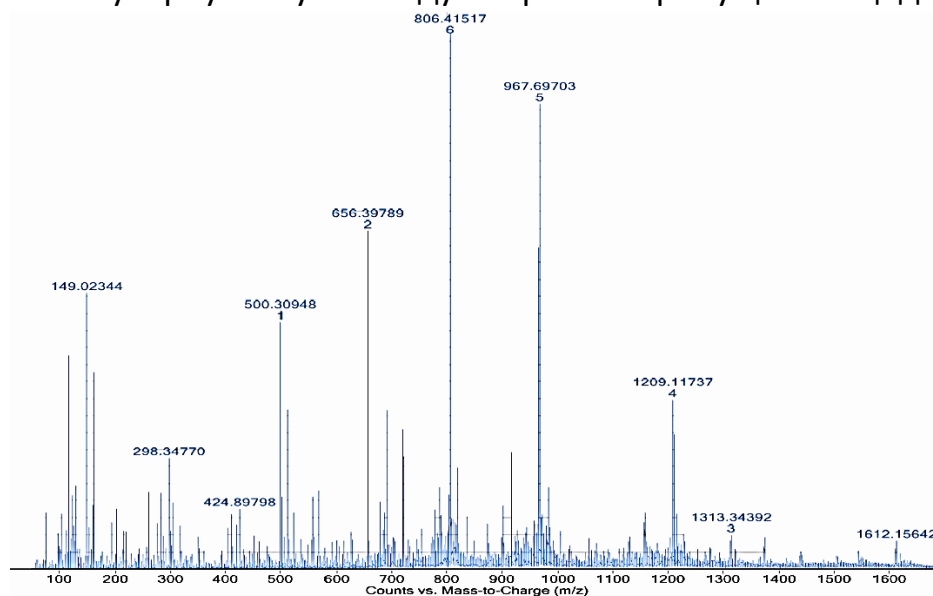
Пам'ятка

- В спектрі вимірюється відношення маси до заряду іонізованих частино (m/z). Інтенсивність піків залежить як від вмісту речовин, так і від умов іонізації тому не може вважатися кількісно. Приблизні порівняння кількості можливі тільки для сполук дуже близької структури (протеїн і його мічена форма, скажімо).
- Наявність іонів може впливати на
- В спектрах протеїнів при електроспрейній іонізації (ESI) спостерігаються піки що відповідають різним ступеням протонування протеїнів.
- В MS/MS спектрах можна спостерігати піки що відповідають почерговій дисоціації залишків окремих амінокислот від молекулярного іона – на основі цього можна встановити послідовність пептиду.

Обов'язковий рівень

Приклад 1

Нижче наведено мас-спектр (ESI) пептиду довжиною біля 40 амінокислот отриманого твердофазним синтезом. Заряди розставлені під масами піків автоматично і можуть не відповідати реальним значенням. Розрахуйте молекулярну масу пептиду й зробіть припущення щодо природи домішок.



Розв'язок: Пептид довжиною 40 амінокислот скоріш за все буде мати молекулярну масу в діапазоні $(100..140) \cdot 40 = 4000..5600$ Да. Діапазон спектру – m/z приблизно від 50 до 1700. В ньому будуть спостерігатися піки, які відповідають протонуванню пептиду одразу по кількох залишках – $(M+3H)^{3+}$, $(M+4H)^{4+}$ і т. п. Їм будуть відповідати піки при $m/z = (M+3)/3$, $(M+4)/4$. Спочатку випишемо найбільш чітко виражені піки на спектрі (колонка m/z). Пік 1209,12 може належати пептиду з масою в діапазоні 4000..5600

m/z	z	$M = (m/z) \cdot z - z$	
1209,12	4	4832,48	
967,7	5	4833,5	
806,42	6	4832,52	
656,4	7	4587,8	Інша речовина

тільки якщо він відповідає заряду +4 ($4 \cdot 1209 \approx 4828$). Припустимо що інші піки вони відповідають послідовним вищим зарядженим станам пептиду (колонка z). Тоді рахуємо відповідні молекулярні маси пептидів: $M = (m/z) \cdot z - z$ (маса зарядженої частинки мінус кількість протонів на ній).

З таблиці видно, що три основні піки відповідають одному пептиду з молекулярною масою приблизно 4833. А от пік 656,4 скоріш за все належить якись іншій речовині.

На спектрі також наявний малоінтенсивний пік 1612,16, який відповідає заряду +3 пептиду з молекулярною масою 4833 ($(4833+3)/3 = 1612$), що додатково підтверджує наші висновки щодо маси пептиду. Щодо домішок, то біля кожного з основних піків спостерігається велика кількість дрібніших піків як дещо вищої, так і дещо нижчої молекулярної маси – скоріш за все вони відповідають домішкам у пептиді, що виникли під час поганого введення певних амінокислот в пептидному синтезі. Загальною кількістю піків, що не відповідають бажаному пептиду доволі висока. Хоч мас-спектроскопія й не кількісний метод, але в цій ситуації можна впевнено сказати, що вміст домішок перевищує 10%.

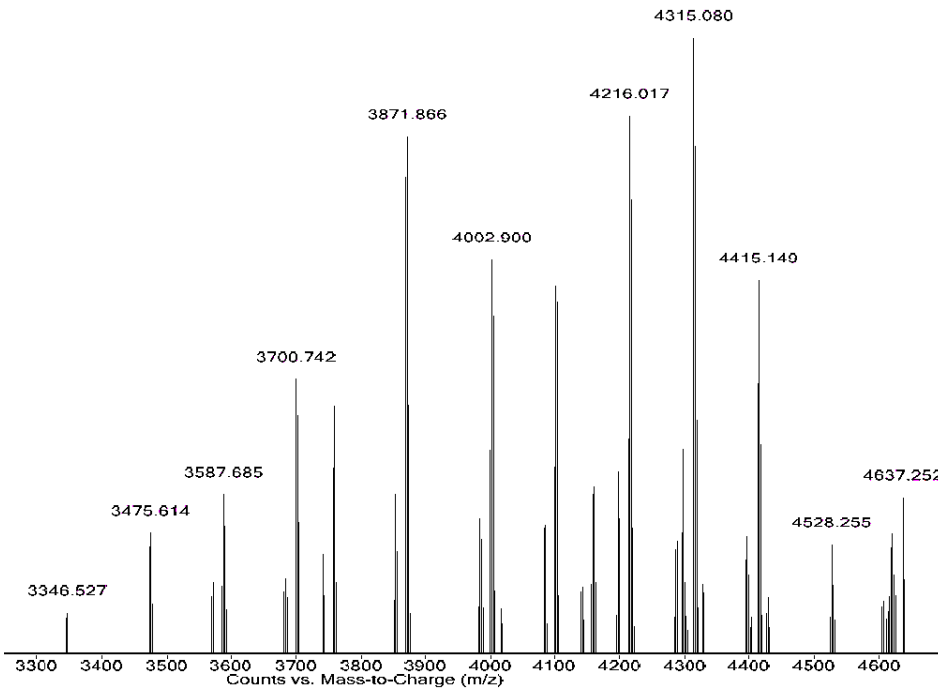
579. В чому різниця між ESI і MALDI?

580. Які піки ви очікуєте в ESI спектрі пептиду ТКАСНУК ?

581. Найбільш інтенсивні піки в MS спектрі протеїну (ESI, вода/ацетонітрил з додаванням TFA) при $m/z = 2000, 1818, 1667, 1538$. Яка його молекулярна маса?

582. Розчин пептиду MARIARAK в суміші ацетонітрил-вода підкислений TFA ввели в ESI мас спектрометр і спостерігали піки 1030 (70%), 1052 (30%). Про що це свідчить?

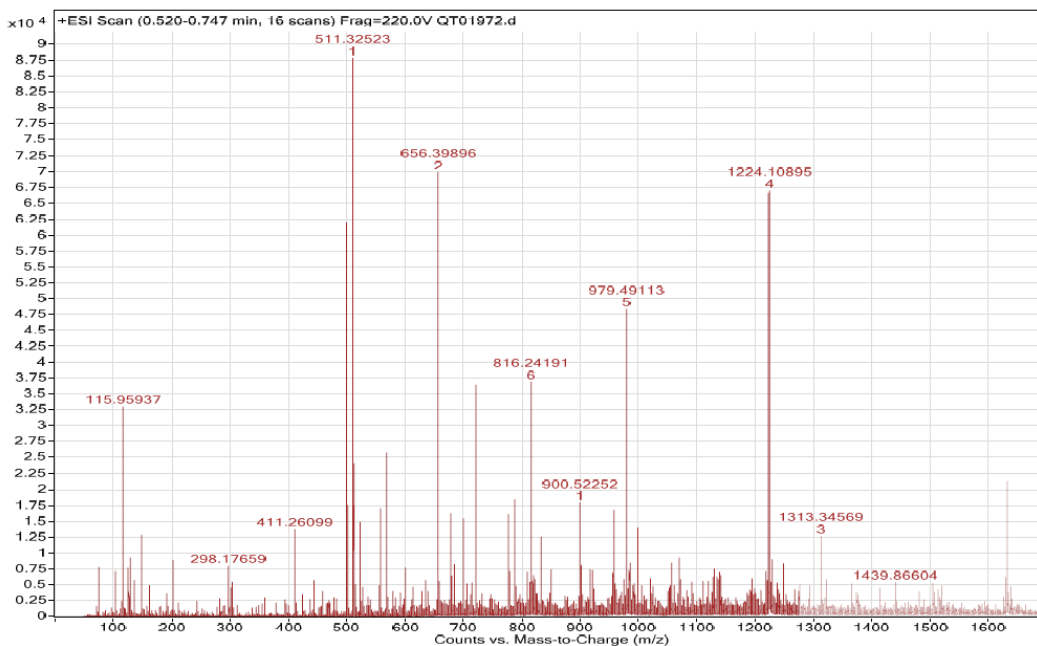
583. Нижче наведено MS-MS спектр пептиду Aβ з однією мутацією (ToF, ESI, $V_{frag} = 220\text{ V}$, дані після деконволюції). Що ви можете сказати по цьому спектру про послідовність пептиду, позицію й тип мутації? Послідовність WT Aβ(1-42): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA.



584. Які іонні сигнали (m/z) і з якими відносними інтенсивностями ви очікуєте спостерігати в депротонованій іонній формі 4-хлорбензойної кислоти (ESI(-) іонізація)?

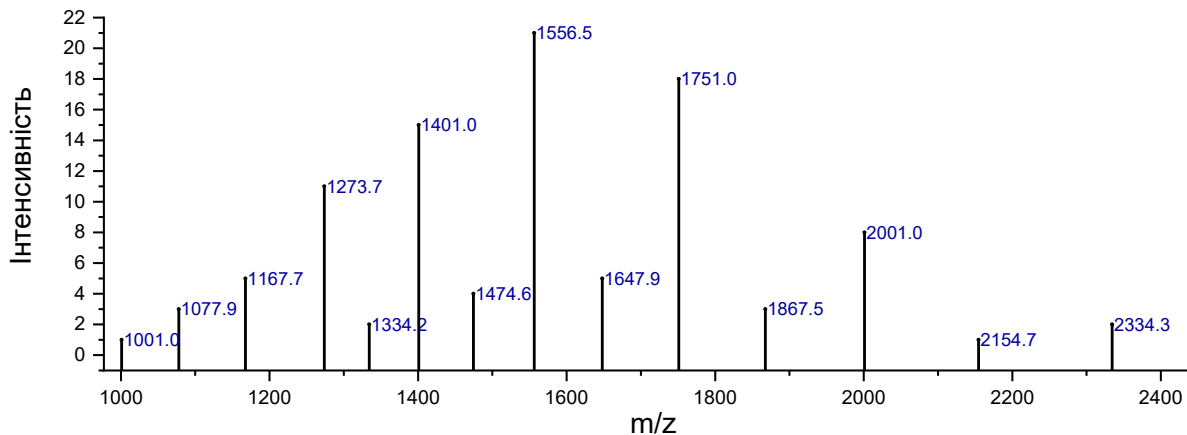
Оцініть молекулярну масу пептиду на основі маспектру (очікувана маса лежить в діапазоні 4-6 кДа)

Inj Vol	0	InjPosition	SampleType	Sample	IRM Calibration Status	Success
Data Filename	QT01972.d	ACQ Method	Comment		Acquired Time	5/20/2010 3:13:59 PM

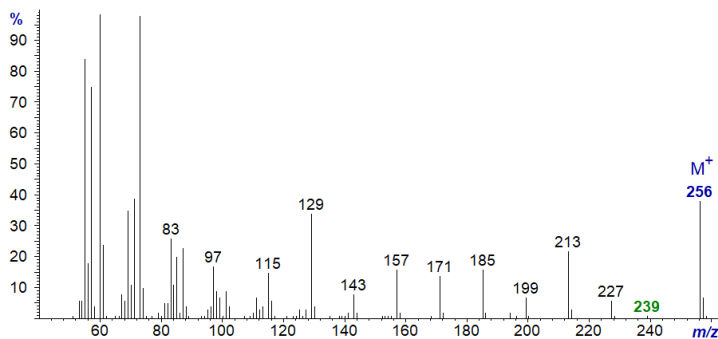


Середній рівень

585. Нижче зображено схематичний вигляд ESI(+) спектру суміші протеїну і його димеру утвореного за рахунок міжмолекулярного дисульфідного зв'язку. Більшість програм для автоматичної деконволюції не враховує інтенсивності піків і некоректно інтерпретує такі спектри. Розрахуйте вручну молекулярну масу протеїну та приблизний відсоток димеру у суміші.



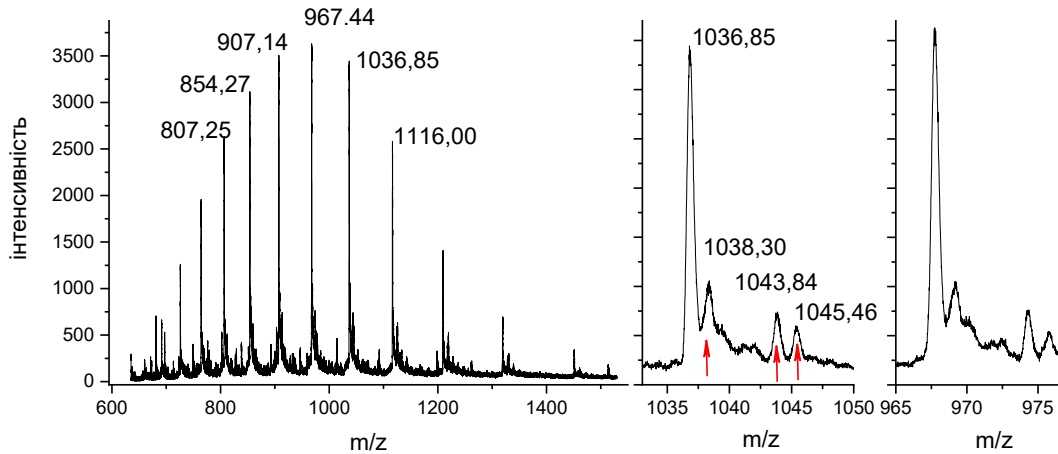
586. Нижче наведено MS-спектр жирної кислоти, яка була одним з основних продуктів при гідролізі жиру полярного ведмедя. Що це за кислота?



Складніші завдання

587. В лабораторії вивчали протеїн α -синуклеїн з молекулярною масою близько 15 кДа та готували його для *in vitro* дослідів експресією в бактеріях. Проте, з'явилися повідомлення, що для властивостей протеїну критично важливим є ацетилювання N-кінця. Тому лабораторія вирішила модифікувати свої підходи до експресії і додатково ввела в бактерії плазмиду з геном ензиму, що дозволяє ацетилювати протеїни. Після експресії й виділення протеїну не було зрозуміло чи

такий підхід спрацював тому вирішили перевірити наявність ацетильної групи за допомогою мас-спектроскопії. Нижче наведено мас-спектр протеїну з молекулярною масою. (ESI (+), вода/ацетонітрил 50/50, 0,1% TFA). Загальний вигляд та окремо два регіони біля найвищих піків. Розрахуйте молекулярну масу протеїну та поясніть ймовірне походження піків позначених стрілочками.



7.7. Хроматографія

RP-HPLC, хроматографія витіснення, афінна хроматографія, іонообмінна хроматографія.

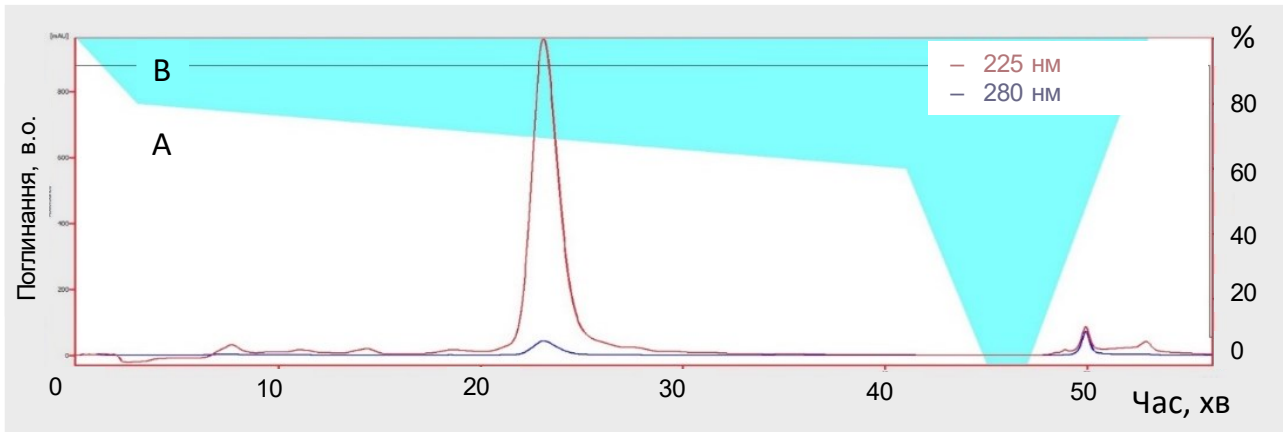
Обов'язковий рівень

588. Вам потрібно виділити пептид GLEKSLVRLGDVQPSLGKESRAKKQRQ з суміші інших пептидів та протеїнів отриманих після фракційного осадження. Для цього ви плануєте використати іонообмінну хроматографію. Катіонну чи аніонну колонку краще застосувати в цьому випадку і чому?

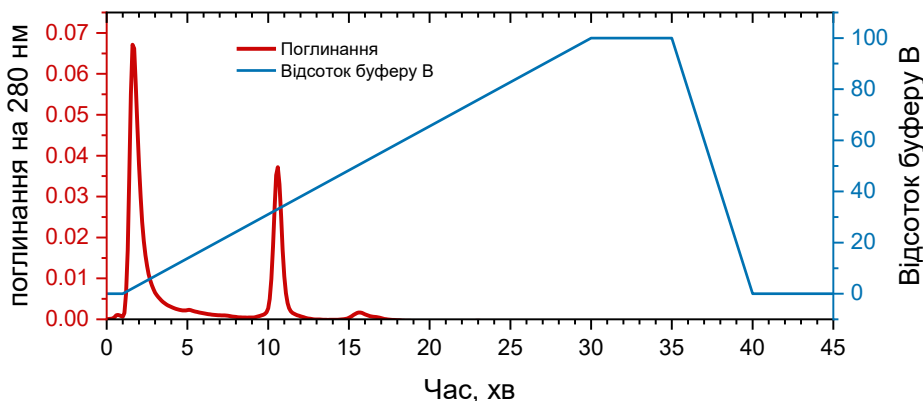
589. В якому порядку виходитимуть з RP-C8 колонки наведені пептиди (лінійний градієнт вода → ацетонітрил, 0,1% TFA): TRATATATRATATA, KPRGPRATRATATA, VWAFAFRAFafa, TRAKAKAKRAKAKA.

590. Нижче зображено приклад іонообмінної хроматограми протеїну використовуючи розчин А: фосфатний буфер рН 7,4; розчин В: фосфатний буфер рН 7,4, що містить 1 М NaCl. Напишіть приблизно програму градієнту, який використовувався в експерименті (таблицю залежності вмісту розчину Б в суміші від часу). Чому на вашу думку виміри поглинання проводились на цих двох

довжинах хвиль? Чому пік домішки з'явився на 50 хв, після моменту найвищої концентрації солі?



591. Нижче зображено приклад іонообмінної хроматограми суміші після мічення 15-кДа протеїну, що містив 1 цистеїн, флуоресцентною міткою. В ній присутні мічений протеїн, дицистеїновий димер протеїну (який утворився внаслідок окислення цистеїну в дисульфід замість мічення) та непрореагована мітка. Який з піків відповідає кожному з компонентів на вашу думку? А: фосфатний буфер рН 7,4; В: фосфатний буфер рН 7,4, що містить 1 М NaCl.



592. Оцініть концентрацію міченого протеїну в зразку, хроматограму якого наведено вище, якщо відомо, що було введено 20 мкл зразку. Потік 1 мл/хв, оптичний шлях в абсорбційному детекторі 1 см. Молярний коефіцієнт поглинання мітки на 280 нм становить $35\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

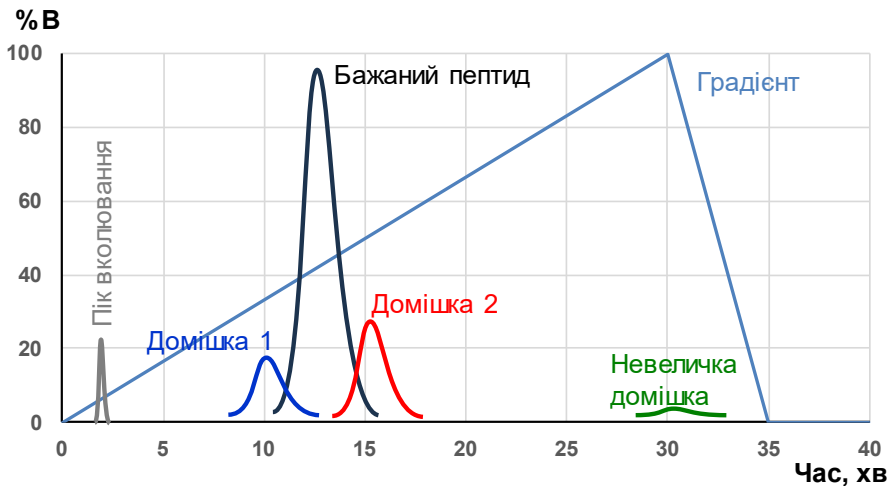
Складніші завдання

Приклад 1

Ваші колеги-хіміки синтезували для вас модифікований пептид і очистили його від низькомолекулярних домішок, проте вам потрібно очистити його від

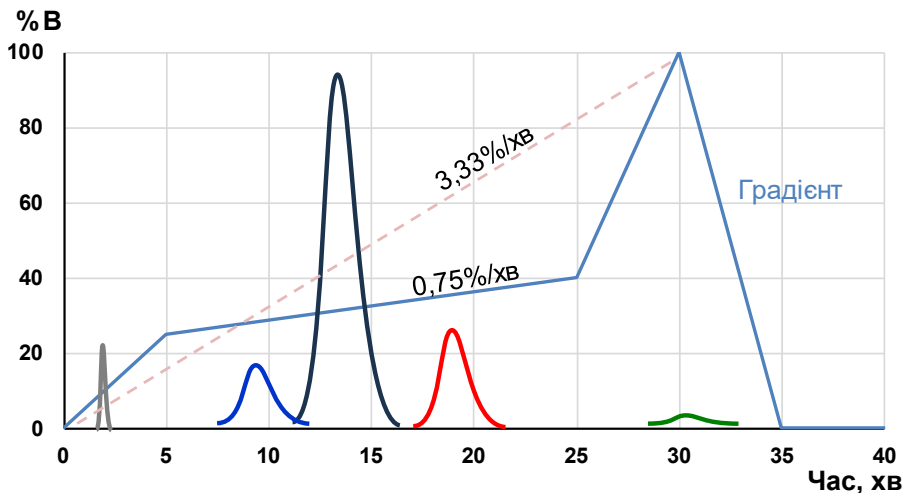
домішок інших пептидів схожої структури (які практично завжди присутні після твердофазного пептидного синтезу). Найкращим способом для цього є оберненофазна ВЕРХ (RP-HPLC) на колонці C6 або C8. В першу чергу ви зробили аналітичне вколювання на вашій єдиній препаративній колонці в лінійному градієнті А: вода+0,1% TFA, В: ацетонітрил+0,1% TFA. C8 і отримали результат схематично зображений нижче.

Запропонуйте градієнт, тривалістю не довше 45 хв для препаративної очистки цього пептиду на такій колонці.



Розв'язок: Для ефективної очистки потрібно досягнути набагато кращого рознесення часу виходу пептиду та домішок. Цього можна досягнути зробивши градієнт більш пологим в діапазоні де виходить бажаний пік, та прискоривши його в інших діапазонах для економії часу.

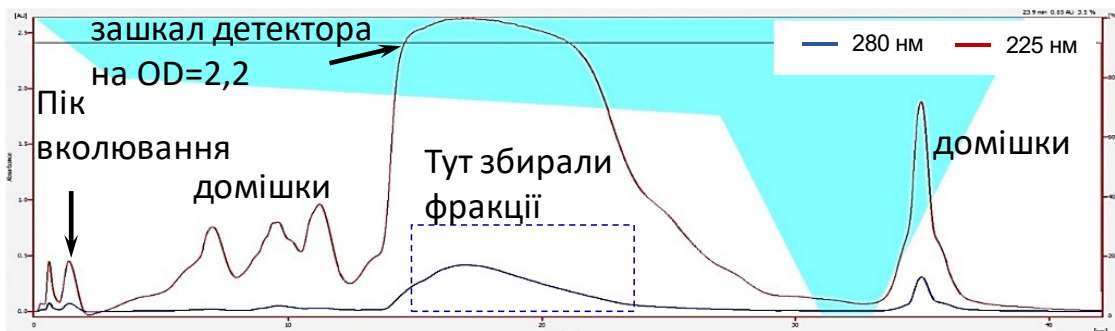
Пік бажаного протеїну виходить приблизно на 12 хв. Пік вколювання – на 2 хв. Отже, бажаний пік виходить з складом суміші. Що входить в колонку на $12 - 2 = 10$ хв, тобто $\approx 33\%$ В. В наявному градієнті зростання %В становить приблизно $100\%/30\text{хв} = 3,3\%/хв$. Одним з можливих варіантів є сповільнити градієнт в діапазоні 25-40% пройшовши це зростання за 20 хв, з середньою швидкістю $0,75\%/хв$ – що в 4,4 рази повільніше за наявний.



В новому градієнті бажаний пептид теж, скоріш за все виходитиме з сумішшю що містить $\approx 33\%$ В. Така суміш входить в колонку на ~ 11 хв і виходитиме, відповідно на 2 хв пізніше, ~ 13 хв. Оскільки новий градієнт приблизно в 4 рази повільніший, то й рознесення між піками буде приблизно в 4 рази більше а самі піки стануть дещо ширшими.

Насамкінець варто зазначити що ми зберегли підйом концентрації В до 100% в кінці градієнту щоб забезпечити вимивання всіх домішок з колонки, а також зберегли повернення до початкових умов в кінці градієнту щоб забезпечити підготовку (еквілібрування) колонки до введення наступного зразка в межах програми.

593. Під час практики в науково-дослідній лабораторії студентам дали завдання очистити протеїн іонообмінною хроматографією. Вони використовували градієнт 20% \rightarrow 40% В за 20 хв (А – рН 7,5 буфер без солі, В – такий самий буфер, але з 1 М NaCl), потік 2 мл/хв, 6 мл колонка. Бажаний протеїн виходив на 18 хв. Фракції по 1 мл збирали автоматизованим пристроєм. Вихідний розчин протеїну був доволі розведений, близько 100 мл 200 мкМ розчину. Щоб зекономити час студенти використовували велику петлю вколювання об'ємом 10 мл та все одно робота зайняла близько дня (10 окремих вколювань). Науковий керівник дещо скептично поставився до якості очистки протеїну студентами і щоб перевірити вколов в таких самих умовах в систему 0,5 мл першої з зібраних фракцій. На жаль, виявилось, що протеїн в ній містив близько 20% домішки, що виходила на 16 хв (на 2 хв раніше піку протеїну). Студенти вирішили, що забруднені фракції можна просто перечистити. Вони об'єднали по 2 перші фракції з кожного вколювання (2 \cdot 10 \cdot 1 мл) та вкололи 10 мл такої суміші в систему. Вони сподівалися що протеїн як і до цього вийде широким піком біля 18 хв з якого можна було б зібрати чисті фракції. Проте, весь протеїн вийшов з колонки десь на 5-7 хв – набагато раніше ніж перед цим. (1) Що стало причиною такої поведінки? (2) Що потрібно було зробити студентам перед повторним вколюванням в пристрій комбінованих фракцій?



7.8. Гель-електрофорез

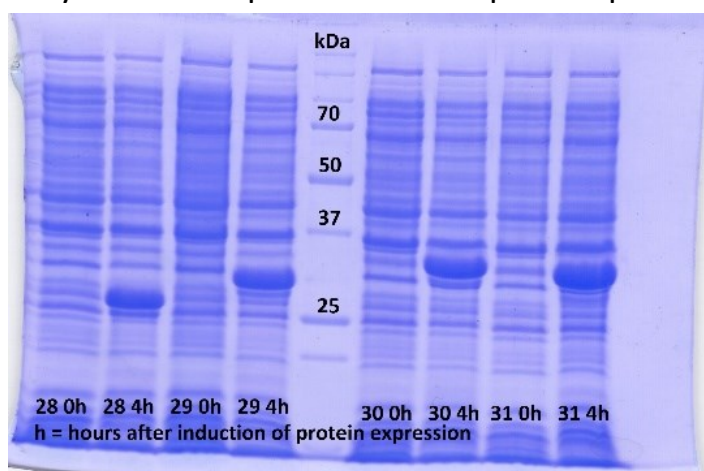
594. В середньому додецилсульфат натрію (SDS) зв'язується з денатурованими білками в співвідношенні 2 молекули SDS на одну амінокислоту. Оцініть заряд альбуміну (~67 кДа) після зв'язування з SDS.

595. Трипсин не здатен проникати крізь мембрани клітин чи розщеплювати протеїни в мембранах, проте він успішно розщеплює поза мембранні частини мембранних протеїнів. Як можна використовувати комбінацію SDS-PAGE та роботи з трипсином для вивчення структури рецепторів?

596. При SDS-PAGE аналізі в лунку зазвичай додають близько 20 мкг протеїну. При профарбовуванні кумасі й якісному проведенні експерименту такі смуги добре видно, а от смужки що відповідають 0,2 мкг протеїну, видно лише ледь-ледь. Для аналізу чистоти отриманого протеїну Олександр додав в лунку 10 мкл розчину з концентрацією 1 мг/мл і отримав красиву смугу на 28 кДа. Оля ж приготувала зразок з концентрацією 5 мг/мл і додала використала дві лунки: в одну додала 2 мкл цього розчину, а в іншу – 12 мкл. Очікувано друга її лунка вийшла перевантаженою й смуги розплилися. Проте, вона була впевнена, що зробила експеримент більш правильно, бо могла детектувати наявність домішок, що присутні в менших кількостях. Який приблизно відсоток домішок могли б побачити Олександр та Оля в своїх експериментах?

597. При аналітичному ультрацентрифугуванні 70 кДа м'язовий білок тропоміозин осідає майже в півтори рази повільніше, ніж 65 кДа білок гемоглобін. Чим це може бути викликано? Яку різницю ви б очікували для швидкості руху цих двох протеїнів на SDS-PAGE?

598. SDS-PAGE часто використовується при приготуванні протеїнів в бактеріальних культурах для оцінки ступеня експресії та чистоти. Нижче наведено приклад гелю на якому аналізували бактеріальні лізати при експресії в *E.coli* 4 різних протеїнів (позначено як 28, 29, 30, 31) зразки до індукції та 4 години після неї. Центральна лунка була використана для стандарту молекулярних мас. На основі цього гелю оцініть молекулярну масу кожного з протеїнів 28,29,30,31. Яку приблизно частку від усієї маси бактеріальних протеїнів складає бажаний білок в цих експериментах?



599. При гель-фільтрації протеїну молекулярну масу оцінили як 200 кДа, проте на денатуруючому SDS-PAGE (в присутності β -меркаптоетанолу) видно лише дві смуги на 35 та 65 кДа. Що ви можете сказати про структуру протеїну на основі таких даних?

600. Оцініть pI протеїну, якщо залежність швидкості його міграції до катоду під час електрофорезу від рН має такий вигляд (від'ємні значення вказують на міграцію до аноду):

pH	5	5,5	6	6,5	7,0
Швидкість, мкм/с	0,50	0,17	- 0,21	-0,52	-0,84

8. Додатки

8.1. Точність вимірювань та похибки

Пам'ятка:

- В більшості випадків значення відомі не абсолютно точно, тому по можливості завжди вказуйте похибку вимірювань і визначень. Винятки: коли в контексті не так важливо, яка точність вимірювань
- Якщо похибка не вказана зазвичай очікують, що всі наведені числа вірні, або можливе відхилення лише в останній цифрі. Наприклад, запис $m = 123$ мг значить передбачає, що маса $123 \pm 0,5$ мг, а запис $123,0$ мг – що маса $123,0 \pm 0,05$ мг.
- Значущі цифри – ті, які несуть інформацію й відомі з достатньою точністю.
- Кількість значущих цифр напряму пов'язана з відносною похибкою величини і дозволяє зекономити час не записуючи її в явному вигляді
- При розрахунках намагайтесь завжди подавати відповідь з коректною кількістю значущих цифр (навіть якщо калькулятор чи програма показують більше значення)
- Якщо відповідь є результатом ділення чи множення то рахуйте кількість значущих цифр в найменш точному числі й використовуйте на 1 більше (запасна цифра допомагає уникнути накопичення помилок при розрахунках). У випадку розрахунку логарифму (скажімо при розрахунку pH) вказуйте на одну цифру більше.
- Запис типу $12,3456 \pm 2,3456$ не інформативний, його краще подавати як $12,3 \pm 2,3$
- Якщо величина вимірюється непрямо, скажімо якщо концентрація оцінюється як відношення маси до об'єму, то похибку цієї величини можна розрахувати по похибках реально виміряних величин, що входять в формулу обчислень.
При діленні та множенні відносні похибки додаються.
При додаванні й відніманні додаються абсолютні похибки.
В більш складних випадках можна скористатися правилом часткових похідних або (що часто простіше) просто підставити два граничні значення в формулу.

Операція	результат	очікувана похибка	Найгірша можлива похибка
$(A \pm \Delta A) + (B \pm \Delta B)$	$A + B$	$\sqrt{(\Delta A)^2 + (\Delta B)^2}$	$\Delta A + \Delta B$
$(A \pm \Delta A) - (B \pm \Delta B)$	$A - B$	$\sqrt{(\Delta A)^2 + (\Delta B)^2}$	$\Delta A + \Delta B$
$(A \pm \Delta A) \cdot (B \pm \Delta B)$	$A \cdot B$	$AB \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2}$	$AB \cdot \left(\frac{\Delta A}{A} + \frac{\Delta B}{B}\right)$
$\frac{(A \pm \Delta A)}{(B \pm \Delta B)}$	$\frac{A}{B}$	$\frac{A}{B} \sqrt{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B}{B}\right)^2}$	$\frac{A}{B} \cdot \left(\frac{\Delta A}{A} + \frac{\Delta B}{B}\right)$

Очікувана похибка – це найімовірніша похибка при незалежних похибках величин. Найгірша – коли знаки похибки співпадають. Останній варіант варто використовувати, коли дані отримані на одному пристрої який може мати системну похибку (скажімо маса виміряна одних вагах) або коли приймаються критичні рішення.

Приклад

Масова частка NaCl в розчині $58 \pm 0,1$ г/л. Оцініть його молярну концентрацію.

$$C = W/MW = 58 \pm 0.1 / 58.5 = 0.991 \pm 0.002 \text{ M}$$

В цьому випадку молекулярна маса відома точно і ми просто поділили на неї і масову частку й похибку.

Зверніть увагу, що у відповіді ми зберегли таку кількість цифр, яка відповідає точності вимірювання (похибка зачіпає лишень останній знак).

Задача 4:

$2,7 \pm 0,1$ мг протеїну з $MW = 27,2$ кДа розчинили в $1,55 \pm 0,05$ мл буферу. Яка концентрація утвореного розчину? (xx±yy мкМ)

Розв'язок:

Спочатку розв'язуємо задачу не враховуючи точність вимірів

$2,7$ мг протеїну з $MW = 27,2$ кДа розчинили в $1,55$ мл буферу. Яка концентрація утвореного розчину?

$$W = m/V = 2,7 \text{ мг} / 1,55 \text{ мл} = 1,742 \text{ г/л}$$

$$C = W/MW = 1,742 \text{ г/л} / (27200 \text{ г/моль}) = 6,4 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л} = 64 \text{ мкМ}$$

Потім оцінюємо відносні похибки вимірювань маси та об'єму

Маса $0.1/2.7 = 3.7\%$

Об'єм $0.05/1.55 = 3.2\%$

Сумарна похибка $3.2+3.7 = 6.9\%$

Задача 5

7,0 mg пептиду SPAIN розчинили у 700 μ L DMSO. Яка буде концентрація?

Точність ваг ± 0.1 mg, піпетки ± 5 μ L.

7 $\pm 0,1$ мг

0,7 $\pm 0,005$ мл

MW = 500 г/моль

$W = m/V = 7 \text{ мг}/0,7 \text{ мл} = 10 \text{ г/л} (\pm(1,4\%+0,7\%)) = \pm 2,1\%$

$C = W/MW = 10 \text{ (г/л)}/500 \text{ (г/моль)} = 0.02 \text{ моль/л} = 20 \text{ мМ} \pm 2,1\% = 20 \pm 0,4 \text{ мМ}$

Задача 6. (значущі цифри)

123 мл розчину, що містить 13,525 г NaCl. Яка його молярність, якщо молекулярна маса 58,44 г/моль?

Розв'язок

Кількість значущих цифр в величинах

123 мл 3

13,525 г 5

58,44 г/моль 4

Результат 3

(три значущі цифри)

Задача 7. (значущі цифри)

Який pH 0,2 мМ розчину HCl?

Розв'язок

0,2 мМ \rightarrow 1 значуща цифра

$\text{pH} = -\lg(0,0002) = 3,6989700\dots \approx 3,69$ (три значущі цифри)

1. 3 $\pm 0,1$ мг барвника молекулярною масою 554 г/моль розчинили в 200 ± 2 мкл ДМСО. Яка концентрація утвореного розчину?
2. На вагах, які дають точність 0,1 мг, зважили мозок молодої миші й отримали значення 552 мг. Яка відносна похибка такого зважування?

Література до розділу

- Gierlinski, Marek; **Understanding statistical error: a primer for biologists** / ISBN 978-1-119-10691-3 (pbk.)

8.2. Приготування розчинів

Перед приготуванням розчину потрібно чітко зрозуміти:

- Скільки розчину вам потрібно приготувати. Тобто і мінімально необхідний об'єм, і те, чи можна приготувати більше а зайве вилити.
- Наскільки точно вам потрібно знати концентрацію. Переважно немає потреби готувати розчини з відносною точністю концентрацій більш ніж на порядок вищою за точність вимірювань що ви робитимете.
- Чи є у вас наявності всі реактиви й посуд для початку приготування
- Наскільки розчин дорогий і цінний.
- Чи буде він використовуватися іншими людьми
- Наскільки повинна бути витримана чистота й стерильність розчину.
- Наскільки довго він стоятиме і де (тип посуду, якість захисту підпису від стирання).

Зважування.

Ваги на 1мг-200 г дають похибку близько 0,1мг

Ваги на 0,1г-200 г дають похибку близько 0,1мг

Якщо потрібно приготувати відомої концентрації розчин дорогої речовини, якої є до 10 мг, то відважувати точні маси типу 3,0 мг непрактично. Набагато точніше взяти приблизно потрібну кількість зважену точно (скажімо вийшло відсипати 3,1 мг, коли хотіли близько трьох міліграм) і перерахувати об'єм на таку масу речовини.

Те, що ви зважуєте повинно відповідати цілі й цінності реактивів. На листок чистого паперу не варто важити дорогі ліпіди чи барвник. Фольга або спеціальний воскований папір для цього підходять набагато краще. З пластикових лодочок для зважування зручно пересипати в стакани, але практично неможливо в мікропробірки. Дешеві неорганічні солі можна важити напряму в чисті й сухі стакани.

Завжди зважуйте тільки в пустий посуд (на окремий листок, лодочку). Змішувати речовини можна тільки після того як закінчили зважування, переконались що це саме та речовина, що ви хотіли і саме та маса.

Намагайтесь ніколи не повертати назад в банку речовину, яку насипали в завеликій кількості при зважуванні. Бувають винятки, але завжди оцінюйте ризик того, що ви забрудните речовину, що залишилась в банці.

Вимірювання об'ємів.

Піпетки на 100-1000 мкл мають похибку десь 1-2 мкл

20-200 і 10-100 – десь 0,5 мкл

2-20 – десь 0,2 мкл (залежить від типу носиків)

0,5-2,5 – десь 0,1 мкл

Для в'язких розчинів похибка може бути більшою

Вимірювати об'єми менше 0,5 мкл піпетками не рекомендується. Спеціально пристосовані шприци ("гамільтонки") дають вищу точність, особливо коли потрібно витримати відношення об'ємів, а не самі об'єми. Якщо потрібна висока точність вимірювання об'ємів (краще $\pm 1\%$) можна просто зважити додані розчини.

Вимірювати об'єми менше 2 мкл піпетками не рекомендується

Завжди обирайте піпетку найменшу піпетки з тих, якими можна відміряти ваш об'єм – це дає меншу похибку.

Перед відповідальними вимірами логічно перевірити піпетки. Для цього ставити на ваги стакан, накручуєте піпетку приблизно на половину максимального об'єму і додаєте в стакан 10 раз воду оцінюючи реально доданий об'єм по приросту маси.

Мірні циліндри переважно дають достатню точність об'ємів при приготуванні буферів. Градуйовані пластикові пробірки на 50 мл ("фалкони") – дещо меншу ніж потрібно в деяких експериментах. Позначки на пластикових мікропробірках ("епендорфах") призначені тільки для приблизної оцінки кількості розчинів, що в них залишились.

Підписування й зберігання розчинів

Якість підпису повинна відповідати цінності розчину/реативу й вартості помилки.

Унікальні та цінні речовини чи зразки (умовно кажучи цінністю більше тижня вашої роботи) мають бути підписані принаймні в двох незалежних місцях (наприклад на епендорфі, та на коробці де вони заходиться). Підписи маркером на епендорфах стираються за кілька використань, якщо вони не прикриті зверху скотчем. Підписуйте зразки й розчини так, щоб якщо поставити їх біля десятка схожих ви змогли їх чітко відрізнити. В ідеалі підпис має бути зрозумілим для будь-кого з ваших колег. Наприклад, буферний розчин має мати в підписі склад, рН дату приготування й ім'я власника; розчин барвника – назву чи формулу, концентрацію, розчинник.

Розрахунки при приготуванні розчинів

У випадку концентрованих розчинів іноді варто враховувати, що їх густина відмінна від 1 г/мл. В таких випадках можна шукати значення густини (ρ) у довідниках і враховувати що $m = \rho V$ маса розчину рівна добутку густини на об'єм.

Розчин заданої масової концентрації

Виходячи з твердої речовини

Якщо потрібно приготувати розчин **заданої масової концентрації $a\%$** об'ємом V (л) з твердої речовини то зважують $m(\text{г}) = V(\text{мл}) \cdot a\% / 100\%$ речовини й розчиняють у воді доводячи до потрібного об'єму.

Наприклад: Потрібно приготувати 2% розчин глюкози об'ємом 100 мл.
 $V = 100$ мл, $a = 2\%$.

Маса глюкози яку потрібно взяти: $m = V(\text{л}) \cdot a\% / 100\% = 100 \text{ мл} \cdot 2\% / 100\% = 2\text{г}$.

Об'єм води: довести до 100 мл. (потрібно буде $100 \text{ г} - 2\text{г} = 98\text{г}$ води)

Якщо потрібно приготувати розчин **заданої молярної концентрації C моль/л** об'ємом V (л) з твердої речовини то зважують $m(\text{г}) = V(\text{л}) \cdot C(\text{моль/л}) \cdot MW(\text{г/моль})$ речовини й розчиняють у воді доводячи до потрібного об'єму.

Наприклад: Потрібно приготувати 1М розчин NaCl об'ємом 100 мл.

$V = 100 \text{ мл} = 0,1 \text{ л}$, $C = 1 \text{ моль/л}$, $MW = 58,5 \text{ г/моль}$.

Маса солі, яку потрібно взяти: $m(\text{г}) = V(\text{л}) \cdot C(\text{моль/л}) \cdot MW(\text{г/моль}) = 0,1 \cdot 1 \cdot 58,5 = 5,85 \text{ г}$.

Об'єм води: довести до 100 мл. (потрібно буде 100 г - 5,85 г \approx 94 г води)

Виходячи з кристалогідрату

Якщо потрібно приготувати розчин **заданої масової концентрації $a\%$** об'ємом **V (л)** певної солі, але наявний її кристалогідрат, то зважують $m(\text{г}) = V(\text{мл}) \cdot (a\%/100\%) \cdot MW(\text{кристалогідрату})/MW(\text{солі})$ речовини й розчиняють у воді доводячи до потрібного об'єму.

Наприклад: Потрібно приготувати 2% розчин CuSO_4 об'ємом 100 мл, а в наявності є $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

$V = 100 \text{ мл}$, $a = 2\%$, $MW(\text{CuSO}_4) = 159 \text{ г/моль}$, $MW(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 249 \text{ г/моль}$

Маса кристалогідрату, яку потрібно взяти:

$m(\text{г}) = V(\text{мл}) \cdot (a\%/100\%) \cdot MW(\text{кристалогідрату})/MW(\text{солі})$

$m(\text{г}) = 100 \text{ мл} \cdot (2\%/100\%) \cdot (249/159) = 3,13 \text{ г}$.

Якщо потрібно приготувати розчин **заданої молярної концентрації C моль/л** об'ємом **V (л)** певної солі, але наявний її кристалогідрат, то потрібну масу розраховують аналогічно приготуванню звичайної солі використовуючи в розрахунках молекулярну масу кристалогідрату $m(\text{г}) = V(\text{л}) \cdot C(\text{моль/л}) \cdot MW(\text{г/моль})$ речовини й розчиняють у воді доводячи до потрібного об'єму.

Наприклад: Потрібно приготувати 100 мМ розчин Na_2HPO_4 об'ємом 200 мл, а в наявності є $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

$V = 200 \text{ мл} = 0,2 \text{ л}$, $C = 0,1 \text{ моль/л}$, $MW(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}) = 358 \text{ г/моль}$.

Маса солі, яку потрібно взяти: $m(\text{г}) = V(\text{л}) \cdot C(\text{моль/л}) \cdot MW(\text{г/моль}) = 0,2 \cdot 0,1 \cdot 358 = 7,16 \text{ г}$.

Виходячи з концентрованого розчину

► не враховуючи густину (для розведених розчинів)

Якщо потрібно приготувати розчин **масової концентрації $a\%$** об'ємом **V_f** певної речовини, виходячи з її розчину масової концентрації **$b\%$** , то потрібно взяти $V = V_f \cdot a/b$ концентрованішого розчину й довести водою до об'єму V_f .

Наприклад: Потрібно приготувати 2мл 0,1% розчину глюкози виходячи з її 2% розчину.

$V_f = 2$ мл, $a = 0,1\%$, $b = 2\%$. Потрібно взяти $V = 2 \text{ мл} \cdot 0,1\% / 2\% = 0,1$ мл двовідсоткового розчину та решту ($1 - 0,1 = 0,9$ мл – води).

Для розчинів певних молярних концентрацій розрахунки аналогічні: $V = V_f \cdot a / b$

Наприклад: В наявності є 123 мкМ розчин протеїну Р, а потрібно приготувати 100 мкл 10 мкМ його розчину. Тут $V_f = 100$ мкл, $a = 10$ мкМ, $b = 123$ мкМ. Використовуємо $V = V_f \cdot a / b = 100 \text{ мкл} \cdot 10 \text{ мкМ} / 123 \text{ мкМ} \approx 8,13$ мкл концентрованого розчину та $100 - 8,13 = 91,87$ мкл води.

► Враховуючи густину (для концентрованих розчинів)

Якщо один з розчинів є достатньо концентрованим, скажімо 25% аміак чи 50% сульфатна кислота, то його густина сильно відрізняється від 1 г/мл і її потрібно враховувати в розрахунках.

Наприклад: Потрібно приготувати 10% розчин сульфатної кислоти (500 мл) виходячи з 96% концентрованого розчину.

Знаходимо густини в таблицях (онлайн)

96% H_2SO_4 – $\rho \approx 1,84$ г/мл

10% H_2SO_4 – $\rho \approx 1,07$ г/мл

Потрібно приготувати $m = V \cdot \rho = 500 \text{ мл} \cdot 1,07 \text{ г/мл} = 535 \text{ г}$ 10%-розчину сульфатної кислоти. В ньому міститься $535 \text{ г} \cdot 10\% / 100\% = 53,5 \text{ г}$ чистої H_2SO_4

Така ж кількість міститься в $53,5 / (96\% / 100\%) = 53,5 / 0,96 \approx 55,73$ г її концентрованої (96% кислоти). Така маса концентрованої кислоти має об'єм $55,73 \text{ г} / (1,84 \text{ г/мл}) = 30,28$ мл.

Тобто потрібно взяти 30,28 мл 96% кислоти та додати її у воду, а потім довести об'єм водою до 500 мл.

Приготування дуже розведених розчинів

У випадку приготування дуже розведених розчинів кількість потрібної речовини (наважка чи об'єм) можуть бути дуже малою й не зручною для вимірів. У такому випадку доречно використовувати поступове розведення.

Наприклад: У вас є розчин флуоресцеїну концентрації 110 мкМ і потрібно приготувати 10 нМ розчин об'ємом 1 мл. Якщо б це робити напряму, то довелося б брати $V = 1000 \text{ мкл} \cdot 10 \text{ нМ} / 110000 \text{ нМ} \approx 0.091 \text{ мкл}$ концентрованого розчину.

Об'єми менше 0,5 мкл неможливо кількісно за допомогою стандартних (мікро)піпеток. Тому розведення потрібно робити в два етапи.

Стратегія: Спочатку готуємо 1 мкМ (= 1000 нМ) розчин, а потім вже з нього розводимо до 10 нМ.

Для 1000 мкл 10 нМ розчину потрібно $1000 \text{ мкл} \cdot 10 \text{ нМ} / 1000 \text{ нМ} = 10 \text{ мкл}$ розчину з концентрацією 1000 мкМ. Проте, скільки цього (1 мкМ) розчину готувати визначається не тим, скільки його реально потрібно, а тим, які об'єми вихідного розчину можна поміряти з хорошою точністю. Вважається, що стандартними мірними піпетками зручно відбирати об'єми близько 5-10 мкл. Для приготування 1000 мкл (= 1 мл) 1 мкМ розчину флуоресцеїну потрібно $1000 \text{ мкл} \cdot 1 \text{ мкМ} / 110 \text{ мкМ} \approx 9,1 \text{ мкл}$ розчину з концентрацією 110 мкМ.

Тобто хід приготування буде виглядати так

Крок 1: 991 мкл води + 9,1 мкл розчину з концентрацією 110 мкМ → проміжний розчин (1 мкМ)

Крок 2: 990 мкл води + 10 мкл проміжного розчину → 1000 мкл 10 нМ розчину.

Для роботи з малими об'ємами та концентраціями найчастіше застосовують мікропіпетки 0,1..2,5 мкл та 1..10 мкл а також мікропробірки (епендорфи) об'ємом 500 або 1500 мкл.

З таким обладнанням зручно працювати з розчинами об'ємом від 30 до 1000 мкл. Надто малі об'єми (<20 мкл) важко набирати з епендорфа, а надто великі не можна набрати за один раз.

При послідовному розведенні зручно розводити не більше ніж в 200 раз.

Те, скільки готувати проміжного розчину визначається не тим, скільки його реально потрібно, а тим, які об'єми вихідного розчину можна поміряти з хорошою точністю. Вважається, що стандартними мірними піпетками зручно відбирати об'єми близько 5-10 мкл (піпетка 1..10 мкл) чи ~2 мкл (піпетка 0,5..2,5 мкл). При роботі з малими об'ємами не заглиблюйте носик піпетки в концентрований розчин більше, ніж на 3 мм – це призведе до того що помітна

кількість розчину залишиться на зовнішній стінці носика (до 0,1-0,3 мкл для малих носиків).

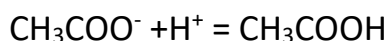
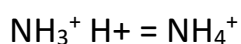
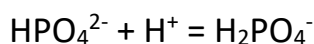
Для скидання краплин розчину з кришки мікропробірки використовуйте міні-центрифуги (2-3 секунди). Приділяйте увагу ефективності перемішування (застосовуйте при потребі вортекс). Якщо працюєте з розчинами протеїнів які схильні пінитись, то збивання піни центрифугацією на міні-центрифузі скоріш за все буде необхідним при відбиранні останніх 100 мкл з мікропробірки.

8.3. Буферні розчини

Теорія

Буферний розчин – розчин, що мало змінює рН при додаванні незначних кількостей кислот чи лугів. Що значить "незначних" і "мало" в цьому контексті? На практиці в біологічних дослідженнях буферним розчином можна вважати такий, який буде міняти рН менше ніж на 0,1-0,2 при будь-яких маніпуляціях, які ви плануєте. Скажімо у вас є 10 мкМ розчин протеїну до якого ви плануєте додати 20 мМ саліцилової кислоти. В цьому контексті "буфером" буде розчин який не змінить рН помітною мірою при додаванні 20-30 мМ кислот. Якщо ж ви працюєте з мікромольними концентраціями, то вимого до ємності буферів дещо нижчі.

Основним компонентом буферного розчину є пара протонувана/депротонувана кислота в широкому розумінні цього слова. Наприклад



Приблизна формула для рН буферів: $pH = pKa + \text{Lg} \frac{[An^-]}{[HAn]}$, де рКа є десятковим логарифмом константи рівноваги протонування.

Додавання кислоти чи лугу дещо зсуває рівновагу між An- та HAn, але якщо ці зміни малі (менше 10%), то рН змінюється дуже слабо через логарифмічний вид залежності. Скажімо якщо в 20 мМ фосфатному буфері з рН = 7,2 при якому $[\text{HPO}_4^{2-}] = [\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 10$ мМ додати 1 мМ кислоту, то запротонується відповідна кількість іонів. $[\text{HPO}_4^{2-}] = 9$ мМ; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 11$ мМ, але рН зміниться тільки на $\log(10/9) - \log(11/10) = 0,09$ одиниці. Як легко помітити, така мала зміна відбувається тому, що концентрації і протонуваної й депротонуваної форми буферної сполуки суттєво більші за концентрацію доданої кислоти. Чим далі рН який буферного розчину від рКа, тим далі відношення $[\text{HAn}]/[\text{An}]$ від 1 і тим менша ємність буферного розчину. Скажімо, в 20 мМ фосфатному буфері з рН = 6. $[\text{HPO}_4^{2-}] \approx 1,2$ мМ; $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 18,8$ мМ і додавання до нього 1 мМ кислоти змінить рН уже 0,8 одиниць, до 5,2.

Тобто для рН = рКа буферна ємність це приблизно 1/10 від концентрації. Для рН що відрізняються від рКа на 1 вона падає в 10 раз (до 0,01 від концентрації). Використовувати буфери в діапазоні рН далі ніж 1 від рКа стає дуже не ефективно і може призвести до неочікуваних помилок. Якщо використовувати суміш двох різних кислот або багатоосновну кислоту типу лимонної, то можна отримати ширший діапазон буферу.

https://en.wikipedia.org/wiki/Buffer_solution

	pKa	примітки
Tris·HCl	8.07	
HEPES	7,48	
H ₂ PO ₄ ⁻	7,2	фосфат кальцію нерозчинний
CH ₃ COOH	4.8	
Лимонна кислота	3,13; 4,76; 6,4	відповідно працює в pH 2,1-7,5

Дуже часто під словом "буфер" розуміють не тільки розчин з певним pH, а й з певною іонною силою та складом. Скажімо " 10 мМ фосфатний буфер pH 7,4, 150 мМ NaCl"

Приготування

Існує кілька підходів до приготування буферів

Підхід 1: просте доведення кислотою або лугом

Скажімо, щоб приготувати 1 л 10 мМ TRIS, pH 7,4 можна

- розчинити в 900 мл води 1,21 г TRIS
- поставити на магнітну мішалку, під pH-метр та повільно додавати до нього кислоту до досягнення потрібного pH (потрібно приблизно 8 мл 1 М HCl)
- доводимо водою до 1 л

Переваги – простота розчинення. Недоліки – якщо проскочити точку потрібного pH, то щоб виправити помилку доведеться додавати луг, що призводить до збільшення концентрації солей які не передбачені.

Підхід 2: змішування пари розчинів

Скажімо, щоб приготувати 1л 10 мМ фосфатного буферу, pH 7,4, що містить 150 мМ NaCl можна

- приготувати 100 мл 100 мМ гідрофосфату натрію
- приготувати 100 мл 100 мМ дигідрофосфату натрію
- змішати по 50 мл двох розчинів (очікується pH суміші близько 7,1)
- додавати гідрофосфат до отримання потрібного pH (порядку 30 мл)
- взяти 100 мл отриманого розчину, додати до нього потрібну кількість NaCl (твердого або концентрованого розчину), довести водою до 1л.

Переваги – кращий контроль над складом фінального розчину; якщо проскочити точку потрібного рН можна просто додати інший розчин (дигідрофосфату) що ніяк не вплине на точність приготування. Недоліки – потрібно готувати більше розчинів. Оптимальне застосування – коли потрібно готувати буфери різного складу і можна тримати готові концентровані розчини солей.

Врахуйте, що рН-метр в реальності міряє не рН а активність іонів H^+ , яка залежить від температури та іонної сили, тому додавання солі може призвести до зниження показів рН-метра.

Підхід 3: зважування двох солей згідно табличних даних та розчинення

Переваги – можна обійтись без рН-метра, якщо точність $\pm 0,1$ одиниця рН є достатньою. Недоліки – ризик пропустити серйозну помилку, оскільки рН буфера реально не перевірявся.