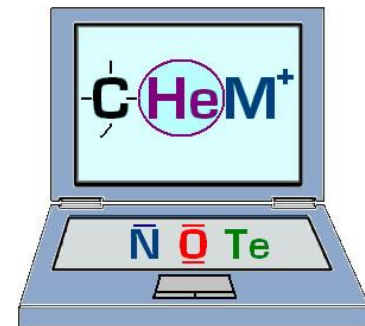




Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



Informace

Seminář z biochemie II

Laboratorní cvičení z biochemie

Pravidla pro udělení klasifikovaného zápočtu ze Semináře z Biochemie II

- **Během semestru bude během výuky napsáno 10 krátkých testů**
 - testy obsahují pouze základní otázky týkající se dané tematiky
 - test je zadán zaškrtačací formou s jednou správnou odpovědí
 - z testů je možno získat celkem 40 bodů (%)
 - testy **NENÍ MOŽNÉ PSÁT V JINÉM TERMÍNU ANI JE OPRAVOVAT**
 - *(pouze v závažných případech, po předložení lékařského potvrzení apod. může asistent navrhnout poměrový přepočet získaných bodů)*
 - body z krátkých testů nejsou podmínkou pro udělení zápočtu
- **Ve 12., 13. a 14. týdnu budou vypsány termíny závěrečného testu**
 - test bude obsahovat převážně problematiku probranou během seminářových hodin (znalost základů je však předpokládána a může být v testech též prověřena)
 - ze závěrečného testu je možno získat 60 bodů (%)
 - student má právo účastnit se všech tří termínů (započítává se nejlepší dosažený výsledek)
 - pokud student vypsany termín nevyužije, **NEMÁ NÁROK NA NÁHRADU**
 - *(pouze v závažných případech a po předložení lékařského potvrzení mu může být asistentem poskytnut jiný termín)*
- **Součet bodů z krátkých testů a závěrečného testu musí být minimálně 50.**

Seminář z biochemie II

- Bioenergetika (příklady)
- Citrátový a glyoxylátový cyklus
- Metabolismus sacharidů I: glykolysa a neoglukogenese
- Metabolismus sacharidů II: synthesa a odbourávání glykogenu, pentosový cyklus
- Metabolismus lipidů I
- Metabolismus lipidů II
- Metabolismus aminokyselin, synthesa neesenciálních aminokyselin
- Dýchací řetězec
- Fotosynthesa
- Kinetika a energetika membránového transportu
- Molekulová genetika I (vztah struktury a funkce nukleových kyselin, replikace a transkripce)
- Molekulová genetika II (proteosynthesa, metody molekulové genetiky)

Speciální upozornění

- **Upozorňujeme studenty 2. roč. FPBT, že podmínkou pro zapsání předmětu Mikrobiologie (5. semestr bakalářského studia) je úspěšné složení zkoušky z Biochemie I !**

Laboratorní cvičení z biochemie

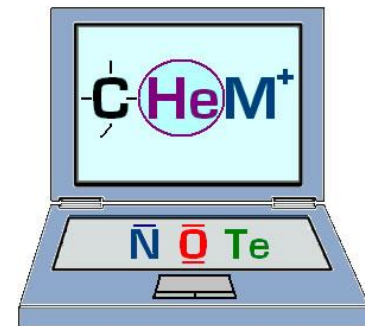
- rozdělit do skupin po 2
- 2 x (teorie+úloha, 2 úlohy, úloha+test)
- laboratoře prakticky NELZE nahrazovat – nutno absolvovat bez absence
- z každé úlohy KAŽDÝ odevzdává samostatně vypracovaný protokol (změřená data pochopitelně stejná jako kolega ze skupiny)
- protokol vrácený po kontrole k přepracování/doplnění = známka o stupeň horší
- klasifikace: $K = (A+B)/2$
 - A = průměr ze dvou testů, psaných v průběhu laboratoří
 - B = průměr z klasifikace odevzdaných protokolů

Laboratorní cvičení z biochemie

- úlohy v „nové“ laboratoři:
 - Dělení makromolekulárních látek gelovou chromatografií
 - Separace trypsinu pomocí iontoměničové chromatografie
 - Štěpení chromogenního substrátu trypsinem (vliv pH, teploty)
 - Immunoprecipitační reakce v roztoku
 - Imobilizace kvasinek, měření aktivity invertasy
- úlohy ve „staré“ laboratoři:
 - Určení sekvence tripeptidu
 - Elektroforetická separace aminokyselin na papírovém nosiči + Stanovení relativní molekulové hmotnosti bílkovin pomocí SDS-PAGE
 - Izolace deoxyribonukleové kyseliny ze sleziny
 - Spektrofotometrické stanovení bílkovin a DNA vedle sebe
 - Titrační křivky aminokyselin



Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti



Bioenergetika

Bioenergetika - úvod

- obor na pomezí biochemie a fyzikální chemie
- zabývá se studiem přeměn energie v živých systémech
- živé organismy jsou otevřené systémy (výměna energie a hmoty s okolím)
- živé organismy jsou v ustáleném stavu dalekém od rovnováhy
- pro popis chemické reakce jsou důležité veličiny entalpie H , entropie S a Gibbsova volná energie G (popisující vzájemný vztah mezi H a S)

Gibbsova volná energie G

- popisuje vzájemný vztah mezi entalpií a entropií: **$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$** (kde ΔG je změna Gibbsovy volné energie; ΔH je změna entalpie; T je teplota; ΔS je změna entropie)
- ΔG charakterizuje tendenci chemické reakce dospět k rovnováze; její „vzdálenost“ od rovnováhy
- ΔG bezprostředně vypovídá o směru reakce, **nikoliv o rychlosti**
- je to stavová veličina (nezávisí na cestě, po níž systém dospěl do daného stavu)
- **$\Delta G > 0$** reakce **endergonická**
- **$\Delta G < 0$** reakce **exergonická**
- pro realizovatelný proces musí platit **$\Delta G < 0$**

Standardní Gibbsova volná energie

$$G_0$$

- použití *standardního stavu* pro zjednodušení výpočtů volné energie (25° C, 101.3 kPa, jednotková koncentrace)
- ΔG^0 je konstantou pro každou konkrétní chemickou reakci
- ΔG^0 ukazuje sílu ženoucí systém do rovnováhy za standardních podmínek
- ΔG^0 nevypovídá nic o směru, energetické náročnosti či realizovatelnosti reakce za reálných podmínek !!
- vzájemný vztah mezi ΔG a ΔG^0 je dán vztahem
 $\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln(\text{součin aktivit produktů} / \text{součin aktivit reaktantů})$
 - (ΔG^0 je změna standardní Gibbsovy energie; R je univerzální plynová konstanta; T je teplota)
- pro systém v rovnováze ($\Delta G = 0$) pak platí **$\Delta G^0 = - R \cdot T \cdot \ln K_{eq}$**
 - (R je univerzální plynová konstanta; T je teplota; K_{eq} je rovnovážná konstanta reakce)

Standardní stav v biochemii

- při použití „klasického“ standardního stavu pro reakci $A + B \rightarrow C + H^+$ je nutno za jednotkovou považovat i koncentraci H^+ , tedy $\text{pH} = 0$, což pro reakce v živých organismech zjevně není vhodné ☺
- „biochemický“ standardní stav, označovaný indexem „'“ je zaveden pro $[A]=[B]=[C]=1$ a $[H^+]=10^{-7}$, čili pro $\text{pH} 7$
- vzájemný vztah mezi $\Delta G^{0'}$ a ΔG^0 je dán vztahem **$\Delta G^{0'} = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln[H^+]^n = \Delta G^0 + n \cdot R \cdot T \cdot \ln[10^{-7}]$** (ΔG^0 je změna standardní Gibbsovy energie; R je univerzální plynová konstanta; T je teplota, n je počet vyměněných protonů v reakci)
- jestliže se při reakci uvolňují ionty H^+ , je reakce preferovaná při $\text{pH} 7$ ve srovnání s $\text{pH} 0$ ($\Delta G^{0'} < \Delta G^0$)
jestliže se při reakci spotřebovávají ionty H^+ , platí ($\Delta G^{0'} > \Delta G^0$)

Důležité vztahy

- $\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln ([\text{produkty}] / [\text{reaktanty}])$
- v rovnováze $\Delta G = 0$ a potom $\Delta G^0 = - R \cdot T \cdot \ln K$
- $\Delta G^{0'} = \Delta G^0 + n \cdot R \cdot T \cdot \ln [H^+]$ (n je záporné, vstupuje-li H^+ do reakce; n je kladné, je-li H^+ v reakci uvolňován)
- $R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} = 1,98 \cdot 10^{-3} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
- $1 \text{ cal} = 4,2 \text{ J}$

Příklady

- Představte si reakci isomerace dihydroxyacetonfosfátu na glyceraldehyd-3-fosfát. V rovnovážném stavu je poměr koncentrací produktu k substrátu 0,0475 při 25°C a pH 7.
 - Spočítejte $\Delta G^{0'}$
 - Spočítejte $\Delta G'$ pro koncentraci substrátu $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l a produktu $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l.
 - Spočítejte $\Delta G'$ pro koncentraci substrátu $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l a produktu $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l
- Známe $\Delta G^{0'}$ následujících reakcí
 - $\text{ATP} \leftrightarrow \text{c-AMP} + \text{PPi}$ $\Delta G^{0'} = 1,6 \text{ kcal/mol}$
 - $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{AMP} + \text{PPi}$ $\Delta G^{0'} = -10,3 \text{ kcal/mol}$
 - Vypočítejte $\Delta G^{0'}$ pro reakci $\text{c-AMP} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{AMP}$



$$\frac{[P]}{[S]} = K = 0,0475$$

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \cdot \ln K$$

$$25^{\circ}\text{C} \Rightarrow T = 298\text{K}$$

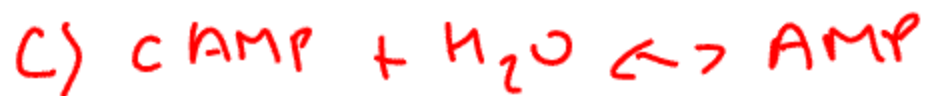
a) $\Delta G^{\circ'} = -8,314 \cdot (273+25) \cdot \ln 0,0475 = \underline{7,55 \text{ kJ/mol}}$

b) $K = \frac{3 \cdot 10^{-6}}{2 \cdot 10^{-4}} = 0,015$

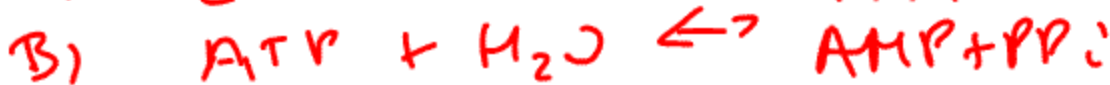
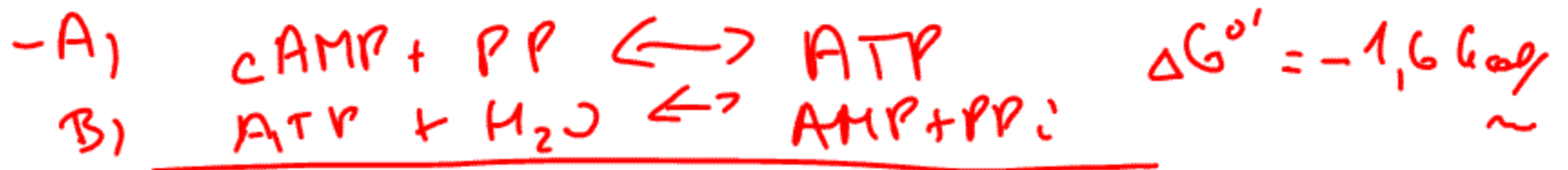
$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + RT \ln K = 7550 - 10405 = \underline{-2,86 \text{ kJ/mol}}$$

c) $K = \frac{3 \cdot 10^{-5}}{2 \cdot 10^{-4}}$

$$\Delta G' = 7550 - 4700 = 2,9 \text{ kJ/mol}$$



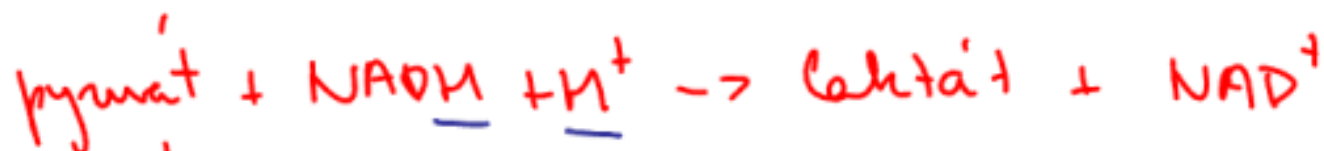
? = -A + B



$\Delta G^{\circ'}_C = -\Delta G^{\circ'}_A + \Delta G^{\circ'}_B = -1,6 + (-10,3) = -11,9 \text{ kcal/mol}$

- Změna standardní Gibbsovy energie pro reakci
 $\text{Pyruvát} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{laktát} + \text{NAD}^+$
 při 25°C a pH 7 je -6 kcal/mol. Vypočtete $\Delta G^{0'}$ pro pH 7,5
- Glukosa-6-fosfát byl enzymově hydrolyzován při pH 7 a 25°C za vzniku glukosy a anorganického fosfátu. Koncentrace reaktantu na počátku reakce byla 0,1 mol/l. V rovnováze zůstalo nepřeměněno pouze 0,05% výchozí látky. Vypočtete rovnovážnou konstantu a příslušnou $\Delta G^{0'}$ pro rozklad Glc-6-P a pro jeho syntézu z glukosy a fosfátu.
- Rozklad citrátu na acetát a oxalacetát je provázen poklesem standardní Gibbsovy energie o 2,85 kJ/mol. Rovnovážná konstanta syntézy citrátu z oxalacetátu a acetylCoA je $3,2 \cdot 10^5$. Vypočtete $\Delta G^{0'}$ hydrolysy AcSCoA na acetát a HSCoA.

③



$$\Delta G^{\circ'}_7 = -6 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^{\circ'}_{7,5} = ?$$

$$\text{pH} \sim -\log [\text{H}^+]$$

$$\ln x = 2.303 \cdot \log x$$

$$\Delta G^{\circ'} = \Delta G^{\circ} + n \cdot R \cdot T \cdot \ln [\text{H}^+]$$

H^+ vstupuje do reakce $\Rightarrow n = -2$

$$\Delta G^{\circ'}_7 + 2RT \ln [\text{H}^+]_7 = \Delta G^{\circ'}_{7,5} + 2RT \ln [\text{H}^+]_{7,5}$$

$$\Delta G^{\circ'}_{7,5} = \Delta G^{\circ'}_7 + 2 \cdot RT \ln [\text{H}^+]_7 - 2RT \ln [\text{H}^+]_{7,5}$$

$$\Delta G^{\circ'}_{7,5} = \Delta G^{\circ'}_7 + 2 \cdot R \cdot T \cdot (\ln [\text{H}^+]_7 - \ln [\text{H}^+]_{7,5})$$

$$\Delta G^{\circ'}_{7,5} = \Delta G^{\circ'}_7 + 2 \cdot R \cdot T \cdot 2,303 (\log [\text{H}^+]_7 - \log [\text{H}^+]_{7,5})$$

$$\Delta G^{\circ'}_{7,5} = \Delta G^{\circ'}_7 + 2 \cdot R \cdot T \cdot 2,303 \cdot (-7 + 7,5)$$

$$\Delta G^{\circ'}_{7,5} = -6000 + 2 \cdot 1,98 \cdot 298 \cdot 2,303 \cdot 0,5$$

$$\Delta G^{\circ'}_{7,5} = -4641 \text{ cal/mol}$$

④



0,05% nepřiměřeno $\Rightarrow [\text{glu-6-P}] = 0,05\% \text{ z } 0,1 \text{ mol/l} =$
 $K = ?$
 $\Delta G^{\circ'} = ?$

$$[\text{glu-6-P}] = 0,1 \text{ mol/l}$$

$$= 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

$$[\text{glu}] = [\text{P}] = 99,95\% \text{ z } 0,1 \text{ mol/l} =$$

$$= 0,09995 \text{ mol/l}$$

$$K = \frac{[\text{produkty}]}{[\text{reaktanty}]}$$

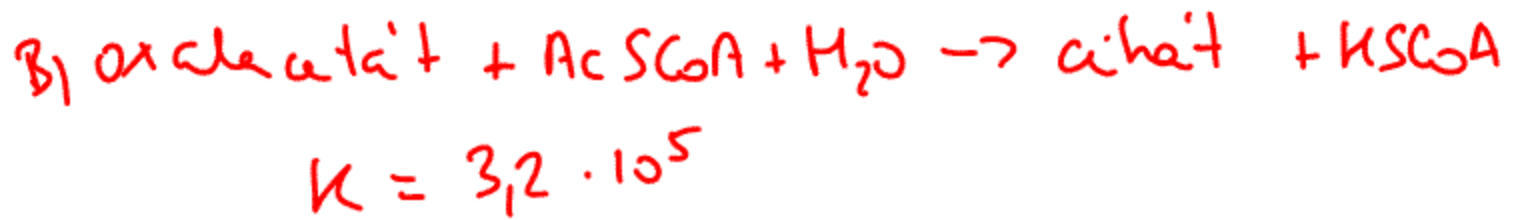
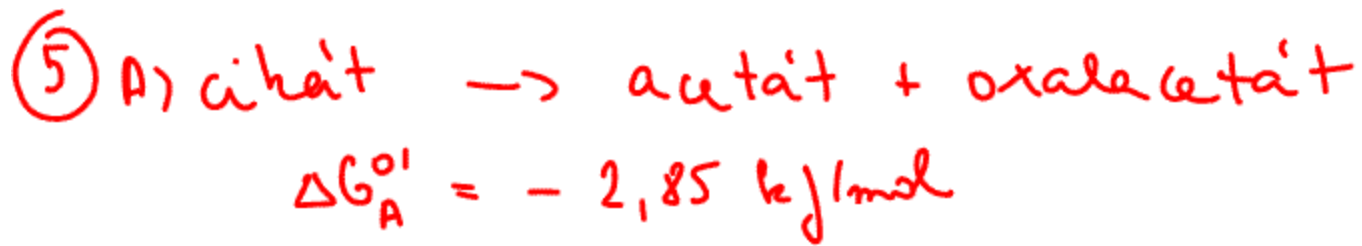
$$K = \frac{0,09995^2}{0,00005} = \underline{199,8}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln K$$

$$\Delta G^{\circ'} = -13,12 \text{ kJ/mol}$$

pro syntézu $\Delta G^{\circ'} = 13,12 \text{ kJ/mol}$

protože $\ln(x^{-1}) = -1 \cdot \ln x$



$$C = A + B$$

$$\Delta G_C^{\circ'} = \Delta G_A^{\circ'} + \Delta G_B^{\circ'}$$

$$\Delta G_C^{\circ'} = -2,85 - 31,4 = \underline{\underline{-34,3 \text{ kJ/mol}}}$$

$$B) \Delta G_B^{\circ'} = -RT \ln K$$

$$\Delta G_B^{\circ'} = -31,4 \text{ kJ/mol}$$

- Pro reakci $A \leftrightarrow B$ kde $\Delta G^{0'} = 4 \text{ kcal/mol}$ nalezněte oblast počátečních koncentrací, kde bude reakce probíhat samovolně.
- Vypočítejte celkovou rovnovážnou konstantu a standardní změnu Gibbsovy energie (pH 7, 25°C) pro konverzi fumarátu na citrát v přítomnosti příslušných enzymů. Jsou známy následující rovnovážné konstanty.
 - fumarát + $H_2O \leftrightarrow$ malát
fumarasa $K1 = 4,5$
 - malát + $NAD^+ \leftrightarrow$ oxalacetát + $NADH + H^+$
malátdehydrogenasa $K2 = 1,3 \cdot 10^{-5}$
 - oxalacetát + $AcSCoA + H_2O \leftrightarrow$ citrát + $HSCoA$
citrátsynthasa $K3 = 3,2 \cdot 10^5$

⑥



$$\Delta G^{\circ'} = 4 \text{ kcal/mol}$$

$$\text{SAMOVOLNĚ} \Rightarrow \Delta G' < 0$$

$$0 < \Delta G^{\circ'} + RT \ln K$$

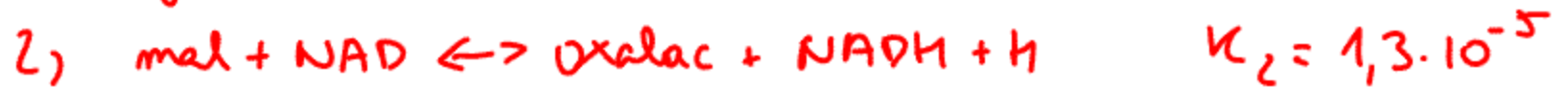
$$\text{limitní podm. } \Delta G' = 0 : -\Delta G^{\circ'} = RT \ln \frac{[B]}{[A]}$$

$$-4000 = 1,98 \cdot 298 \cdot \ln \frac{[B]}{[A]}$$

$$\frac{-4000}{1,98 \cdot 298} = \ln \frac{[B]}{[A]}$$

$$\frac{[B]}{[A]} = 1,14 \cdot 10^{-3} \Rightarrow \underline{\underline{\frac{[B]}{[A]} < 1,14 \cdot 10^{-3}}}$$

⑦



$4) = 1) + 2) + 3)$

$$\Delta G^{\circ'}_4 = \Delta G^{\circ'}_1 + \Delta G^{\circ'}_2 + \Delta G^{\circ'}_3$$

$$\Delta G^{\circ'}_4 = -7,27 \text{ kJ/mol}$$

$$K_4 = 18,8$$

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln K$$

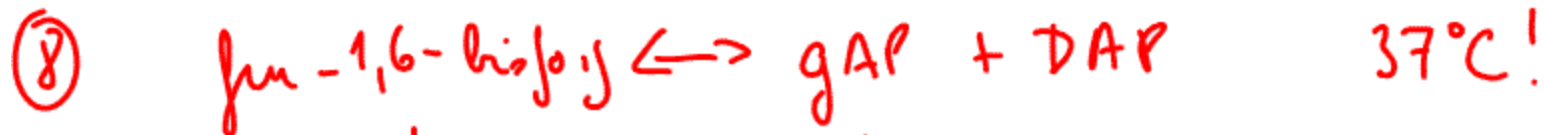
$$\Leftrightarrow \begin{cases} \Delta G^{\circ'}_1 = -3,73 \text{ kJ/mol} \\ \Delta G^{\circ'}_2 = 27,87 \text{ kJ/mol} \\ \Delta G^{\circ'}_3 = -31,41 \text{ kJ/mol} \end{cases}$$

- Pro reakci

fruktosa-1,6-bisfosfát $\leftrightarrow$ glyceraldehydfosfát a dihydroxyacetonfosfát
při 37°C byla určena $\Delta G^{0'} = 24,2$ kJ/mol. *In vivo*
jsou koncentrace jednotlivých látek 31, 18,5 a
138 $\mu\text{mol/l}$ (F-1,6-B, GAP, DAP). Může za těchto
koncentračních poměrů reakce v organismu
probíhat?

- Vypočítejte standardní změnu Gibbsovy energie
pro reakci

fumarát + H_2O $\leftrightarrow$ malát
jsou-li standardní slučovací Gibbsovy energie
fumarátu, malátu a vody za stejných podmínek
rovny -144,41; -201,98 a -56,69 kcal/mol.



$$\Delta G^{\circ'} = 24,2 \text{ kJ/mol}$$

$$T = 273 + 37 =$$

$$= 310 \text{ K}$$

$$[\text{fr}] = 31 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$[\text{GAP}] = 18,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$[\text{DAP}] = 138 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$\Delta G' = ?$$

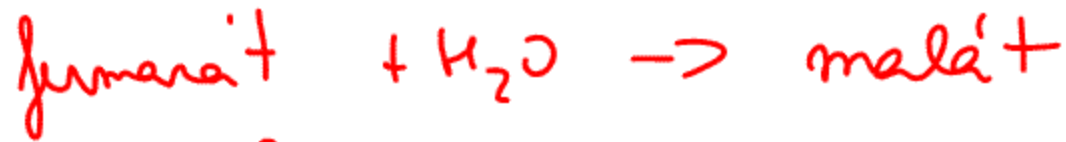
$$\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + RT \ln K$$

$$\Delta G' = 24200 + 8,314 \cdot 310 \cdot \ln \frac{18,5 \cdot 10^{-6} \cdot 138 \cdot 10^{-6}}{31 \cdot 10^{-6}}$$

$$\underline{\Delta G' = -38,5 \text{ J/mol}}$$

SKORO V ROVNOVÁŽE, ALE POBĚŽÍ!

⑨



$$\Delta G^\circ = ?$$

$$\Delta G_F = -144,41 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G_M = -201,98 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G_{\text{H}_2\text{O}} = -56,69 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G^\circ = \Delta G_M - \Delta G_F - \Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$$

$$\Delta G^\circ = -0,88 \text{ kcal/mol}$$

- Jaké jsou relativní koncentrace citrátu, isocitrátu a cis-akonitátu v rovnovážném stavu?
 - citrát $\leftrightarrow$ cis-akonitát + H₂O $\Delta G^{0'} = 2 \text{ kcal/mol}$
 - cis-akonitát + H₂O $\leftrightarrow$ isocitrát $\Delta G^{0'} = -0,5 \text{ kcal/mol}$
- Oxidace malátu na oxalacetát je vysoce endergonická reakce, $\Delta G^{0'} = 7 \text{ kcal/mol}$. Víte, že za fyziologických podmínek reakce probíhá (CC), protože koncentrace produktů jsou mnohonásobně nižší než substrátu. Jaký je poměr koncentrací malát/oxalacetát, při kterém ještě reakce probíhá?
 - pH 7, $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = 8$



normális $\Rightarrow \Delta G^{\circ'} = -RT \ln K$

$$A: 2000 = -1,98 \cdot 298 \cdot \ln \frac{[ako] \cdot [H_2O]}{[citrát]}$$

$$\frac{[AKO] \cdot [H_2O]}{[CITR]} = 0,0337$$

$$B: \frac{[ISOC]}{[AKO] \cdot [H_2O]} = 2,33$$

$$\frac{[ISOC]}{[CITR]} = A \cdot B = 0,0786$$

11



$$\Delta G^{\circ'} = 7 \text{ kcal/mol}$$

limitní podmínka: $\Delta G' = 0$

$$\Delta G^{\circ'} = -RT \ln K$$

$$K = 7,04 \cdot 10^{-6}$$

$$\frac{[\text{NAD}]}{[\text{NADH}]} = 8$$

$$\frac{[\text{oxalec}] \cdot [\text{NADH}]}{[\text{malát}] \cdot [\text{NAD}]} = 7,04 \cdot 10^{-6}$$

$$\frac{[\text{malát}]}{[\text{oxalacetát}]} = \frac{1}{7,04 \cdot 10^{-6}} / 8 = 17750$$

$$\text{PROBÍHA} \text{ pro } \frac{[\text{malát}]}{[\text{oxalacetát}]} > 17750$$