

ÚVOD

Organizace výuky v laboratorním cvičení z biochemie

Laboratorní protokol

Podmínky udělení zápočtu ze cvičení

Pravidla bezpečnosti práce v biochemické laboratoři

První pomoc

Použitá a doporučená literatura

ÚVOD

Studenti se v průběhu cvičení seznámí s vlastnostmi nejdůležitějších nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek vyskytujících se v živých organismech (sacharidy, aminokyseliny, bílkoviny, nukleové kyseliny) a s jednoduchými metodami jejich kvalitativního i kvantitativního stanovení a separace. Pokročilejší úlohy cvičení jsou zaměřeny především na studium vlastností enzymů a kinetiky enzymových reakcí, na zvládnutí metod stanovení enzymových aktivit a na analytické využití enzymů.

Účelem cvičení je zvládnout jak elementární praktické laboratorní úkony, tak i potřebné chemické výpočty a metody vyhodnocování experimentálně získaných dat. **Návody ke cvičením** obsahují nejen popis laboratorních postupů, ale také teoretické základy příslušné úlohy a podrobné požadavky na vyhodnocení experimentálních výsledků. (Návody jsou k dispozici na IS MU jako *Studijní materiály* předmětu *Biochemie – laboratorní cvičení*.) Každý návod je rozdělen několik částí; popsaný *princip úlohy* slouží také k přípravě studentů na krátký úvodní test každého cvičení, *praktická část* podrobně popisuje postup práce ve cvičení, současně může být doplněna experimentálními výsledky a předložena jako laboratorní protokol; obsahuje rovněž podrobný popis požadavků na vyhodnocení získaných dat. Jako přílohy jsou k základnímu textu přiřazeny informace týkající se organizace laboratorního cvičení (sylaby cvičení, organizace výuky, požadavky na sepsání laboratorního protokolu, pravidla bezpečnosti práce v biochemické laboratoři), popis nejběžnějších instrumentálních metod (centrifugace, fotometrie a spektrofotometrie, měření pH), popis obsluhy některých laboratorních přístrojů, soupis použité literatury, chemické vzorce a analyticky významné reakce studovaných látek.

Personál laboratorního cvičení z biochemie:

- vedoucí cvičení pro jednotlivé studijní skupiny:

RNDr. Pavla Boublíková, CSc.

(pověřená vedením předmětu *Biochemie - laboratorní cvičení*,

kontakt: **boublik @chemi. muni.cz**)

- laborantky:

Marcela Hrnčířová

Věra Kratochvílová

Hedvika Říčánková

- technik:

RNDr. Ivo Pluháček

Organizace výuky v laboratorním cvičení z biochemie

Studenti budou většinu úloh (netýká se úvodního cvičení) provádět v pracovních skupinách (dvojice až trojice studentů).

Studenti jsou povinni absolvovat úvodní cvičení. Z ostatních cvičení (číslované úlohy 1 - 12) mohou mít jednu neomluvenou absenci. Cvičení, která odpadnou z důvodů státního svátku, děkanského nebo rektorského volna, případně kvůli změnám rozvrhu stanoveným vedením školy, budou v případě nutnosti nahrazena pro celé seminární skupiny. Zápočet může být udělen pouze studentům, kteří absolvují nejméně 10 číslovaných úloh.

Před zahájením praktických cvičení jsou studenti povinni zúčastnit se školení bezpečnosti práce a svým podpisem potvrdit účast na tomto školení. Studenti rovněž absolvují povinné vstupní testy; pokud neuspějí v prvním termínu, bude jim umožněno psát další variantu testu v náhradním termínu dle domluvy s vedoucím cvičení. V případě, že nezískají potřebné bodové ohodnocení (nejméně 50 %) ani v náhradním termínu, nemohou navštěvovat laboratorního cvičení. V úvodním cvičení budou studenti rovněž řešit jednoduchou praktickou úlohu, při které si osvojí zásady správného používání pipet, dávkovačů a pravidla pro správný postup měření na fotometru.

V úvodu každého cvičení píšou studenti krátký test zaměřený na problematiku konkrétní úlohy. **Během psaní testu je zakázáno používat mobilní telefony.** Při nedostatečných znalostech problematiky úlohy není možné se cvičení zúčastnit a toto cvičení je nutné absolvovat v náhradním termínu. Pokud posluchači nestačí k přípravě na cvičení návody (teoretická část příslušné úlohy) a další literatura (viz příložený seznam literatury), má možnost problematiku konzultovat s vedoucím cvičení v termínu dle vzájemné dohody.

Studenti jsou povinni se do cvičení dostavit včas (tolerováno je zpoždění maximálně 15 minut po zahájení cvičení, delší zpoždění není omlučeno), ve vhodné obuvi a pracovním oděvu (pro odložení venkovní obuvi a oblečení je k dispozici šatna a zamykatelné skříň).

V průběhu cvičení informují studenti vedoucího cvičení o dosažených výsledcích (nevylévejte zkumavky a nelikvidujte fyzicky existující výsledky laboratorní práce dříve, než vyučující zkontroluje experimentální data), experimentálně získaná data zaznamenávají (nikoliv tužkou) do kontrolního listu (je součástí návodu ke cvičení) a po skončení cvičení předloží vedoucímu cvičení kontrolní list k podpisu (podpis vedoucího cvičení je pro studenta dokladem o absolvování cvičení).

V průběhu cvičení jsou studenti povinni dodržovat bezpečnostní a hygienická pravidla a udržovat svoje pracovní místo v čistotě a pořádku. Případné závady, nedostatky, nehody a poranění je třeba ihned oznámit vedoucímu cvičení. Před používáním přístrojů je potřeba seznámit se s jejich obsluhou. Po skončení cvičení je nutné umýt (destilovanou vodou) všechno použité laboratorní sklo i jiné pomůcky, uložit je na původní místo a požádat personál laboratoře o kontrolu pořádku a úplnosti vybavení pracovního místa. V následujícím cvičení studenti odevzdávají laboratorní protokol o cvičení sepsaný na základě získaných experimentálních výsledků ověřených podpisem vedoucího cvičení.

Laboratorní protokol

Do předtištěného textu (praktická část cvičení) studenti doplní experimentální výsledky (opsané z **kontrolního listu, který předkládají opět vedoucímu cvičení jako součást laboratorního protokolu**), výpočty, tabulky, případně závěr. Pro tvorbu grafů je požadováno zvládnutí vhodného počítačového programu (např. Excel). Grafy studenti tisknou na zvláštní list (listy) papíru, je zbytečné vsouvat grafy do textu návodu ke cvičení a tisknout návod znovu.

Protokol se odevzdává v termínu podle požadavku vedoucího cvičení - obvykle v následujícím cvičení. Po dohodě s vedoucího cvičení je možné protokoly odevzdávat buď individuálně, nebo za celou pracovní skupinu, podle požadavku vedoucího cvičení buď v tištěné, nebo elektronické formě.

Podmínky udělení zápočtu ze cvičení

- úspěšné absolvování vstupního testu
- absolvování minimálně deseti číslovaných úloh cvičení s odpovídajícími experimentálními výsledky
- odevzdání příslušných laboratorních protokolů

Při udělování zápočtů přihlíží vedoucí cvičení k teoretickým znalostem studentů (bodování úvodních testů k jednotlivým cvičením – podmínkou udělení zápočtu je získání nejméně 50 % bodů v průměru za celý semestr), praktickým schopnostem studentů (správnost dosažených výsledků), úrovni protokolů (správnost výpočtů, schopnost grafického zpracování výsledků) a včasnosti jejich odevzdání (neúplné a nesprávně zpracované protokoly jsou studentům vráceny k opravě a dopracování).

Upozornění:

Jakékoliv podvádění v testech (používání nedovolených pomůcek) nebo při zpracování protokolů (zpracování zfalšovaných výsledků, opisování protokolů) bude předáno k řešení disciplinární komisi.

Pravidla bezpečnosti práce v biochemické laboratoři

Cvičení z biochemie se nemohou zúčastnit těhotné studentky. Neriskujte zbytečně zdraví svého dítěte - v laboratoři je ohroženo řadou potenciálně teratogenních látek.

Do laboratoře je zakázán vstup osobám, které jsou pod vlivem alkoholu a jiných omamných látek.

V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit (zákaz kouření se vztahuje na celý objekt budovy A15), je zakázáno používat k jídlu a pití laboratorní sklo.

Studenti účastníci se laboratorního cvičení z biochemie jsou povinni dodržovat zejména následující bezpečnostní předpisy:

a) *protipožární pravidla* (v laboratoři se nepracuje s otevřeným ohněm):

- seznamte se s umístěním a způsobem použití hasícího přístroje,
- práce s organickými rozpouštědly je možno provádět pouze v digestoři se spuštěným odtahem,
- je zakázáno vylévat použitá organická rozpouštědla a jejich směsi s vodou do odpadu (vylévají se do lahví k tomu určených);

b) *pravidla pro práci s žiravinami:*

- je zakázáno pipetovat roztoky žiravin ústy, používejte bezpečnostní nástavce na pipety,
- titrační činidla mohou být zředěnými roztoky žiravin, byrety plňte opatrně tak, aby nedošlo k vystříknutí titračního činidla z přetlakového otvoru,
- koncentrované kyseliny a zásady nepipetujte, použijte odměrný válec nebo Pasteurovu pipetu (tyto látky se zpravidla používají jen pro kvalitativní reakce, kde není nutné zcela přesné odměření objemu),
- zahřívání koncentrovaných žiravin i jejich roztoků je nutno provádět velmi opatrně, zásadně ústím zkumavky ve směru od sebe i od ostatních účastníků cvičení,
- koncentrované žiraviny řed'te vléváním tenkého proudu látky do vody po tyčince za současného míchání a chlazení,
- při práci s větším množstvím žiravin používejte ochranné brýle, ochranný štít, gumové rukavice;

c) *pravidla pro práci s jedy:*

- je zakázáno pipetovat roztoky toxických látek ústy, používejte bezpečnostní nástavce na pipety,
- neinhaluujte výpary toxických látek,
- dodržujte pravidla hygieny (mytí rukou); z hygienických důvodů rovněž používejte nástavce na pipety při jakémkoliv pipetování (prevence přenosu infekcí).

d) *pravidla pro práci s elektrickými spotřebiči a laboratorními přístroji:*

- seznamte se s obsluhou základních laboratorních přístrojů podle návodů, které jsou k dispozici,
- s výjimkou předvážek je studentům dovoleno obsluhovat samostatně pouze přístroje umístěné na laboratorních stolech;
- po skončení cvičení přístroje vypněte a odpojte od sítě

e) ostatní pravidla

Skleněné střepy vyhazujte do označené nádoby, nikoliv do běžného odpadkového koše.

S výjimkou zkumavek je nutné nahlásit rozbití skla personálu laboratoře (pro doplnění zásob skla v pracovním stole).

Jakékoliv znečištění laboratorních stolů nebo laboratorních přístrojů (rozsypání chemikálií, vystříknutí nebo vylití roztoků) je nutné ihned odstranit. Rozlité koncentrované kyseliny před utřením nejprve opatrně zřed'te vodou. Zátky od lahví obsahujících roztoky chemických látek nepokládejte na stoly potřísněnou stranou. Udržujte čistotu a pořádek na pracovních stolech.

dále VIZ TÉŽ: http://www.sci.muni.cz/bezpecnost/chm_web/index.htm

Laboratorní řád pro základní cvičení studentů PRO PRÁCI V CHEMICKÉ LABORATOŘI

- Posluchači jsou povinni přicházet do cvičení včas a řádně připraveni. Musí mít provedeny potřebné výpočty, rozumět postupu práce a znát vlastnosti látek se kterými budou pracovat (skupenství, toxicita, hořlavost a pod.).
- Každý posluchač musí mít vlastní pracovní plášť a je povinen po celou dobu cvičení používat ochranné brýle, případně další předepsané ochranné pomůcky (štit, rukavice apod.).
- V laboratoři pracuje student za dozoru vedoucího cvičení nebo instruktora a smí vykonávat jen práce související s náplní cvičení. K práci používá pouze vyhrazený prostor a přidělené pomůcky, za něž osobně zodpovídá.
- K vlastnímu provedení úlohy přistoupí posluchač až po kontrole aparatury učitelem nebo instruktorem. Student nesmí samovolně měnit předepsaný postup práce.
- Před zahájením práce zkontroluje každý student úplnost vybavení svého pracovního místa. Po skončení práce uvede své pracoviště do původního stavu a předá je instruktorovi nebo učiteli. Všechny závady zjištěné před zahájením práce nebo v jejím průběhu neprodleně hlásí vedoucímu cvičení.
- V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit. Zakázáno je též použití laboratorního nádobí k přechovávání potravin. Pro tyto účely bývá mimo prostor laboratoře vyhrazeno místo.
- Chemikálie je zakázáno brát nechráněnou rukou; žíravé a jedovaté látky je třeba pipetovat bezpečnostními pipetami. Při manipulaci s látkami v otevřených nádobách (např. zkumavkách) je nutné odvrátit ústí nádoby od obličeje a je nezbytné dbát na to, aby nesměřovalo k sousedním pracovníkům.
- Všechny manipulace s látkami dýmavými a dráždivými, jedy a látkami snadno těkavými se musí provádět v digestoři při spuštěném ventilátoru. Zde je nutné provádět i přesypávání jemně zrnitých chemikálií (například produktů syntéz uskutečňovaných ve cvičení).
- Při destilaci hořavin je nezbytné z okolí předem odstranit zásobní lahve s hořavinami a jiné chemikálie do bezpečné vzdálenosti a v okolí vypnout všechny zdroje plamene (např. kahany, plamínek průtokového ohříváče apod.). Hořaviny je zakázáno zahřívat nad kahanem. Pro zahřívání hořavin je třeba používat vodní či jiné lázně nebo topná hnízda. Před započetím destilace i v jejím průběhu je nutno vždy zkontrolovat přívod chladicí vody, aby nemohlo dojít k úniku hořlavých par do okolí. Je třeba mít připraveny pomůcky pro hašení požáru.
- Pokud se k zahřívání používá olejová lázeň, musí se její teplota udržovat pod bodem vznícení. Z tohoto důvodu musí být v olejové lázni vždy umístěn teploměr. Vnikne-li do olejové lázně voda, je třeba přerušit zahřívání a lázeň okamžitě vyměnit.
- Roztoky těžkých kovů, organická rozpouštědla, odpadní oleje a jiné s vodou nemísitelné látky je zakázáno vylévat do výlevky. Kyseliny a louhy je možno tímto způsobem likvidovat pouze po důkladném zředění vodou. K likvidaci nebezpečných odpadů slouží přichystané odpadní nádoby. Likvidace těchto odpadů se pak provádí centrálně.
- Skleněné střepy a jiné odpadky s ostrými hranami musí být odkládány do nádob zvlášť k tomu určených. Použité filtry a jiný pevný odpad se ukládá do nádob k tomuto účelu určených.
- Každé drobné poranění, stejně jako bolesti hlavy, hučení v uších apod. je třeba neprodleně hlásit vedoucímu cvičení.
- Po skončení práce je třeba zkontrolovat uzavření plynu, vody a vypnout všechny elektrické spotřebiče. Rovněž je třeba zkontrolovat, zda jsou uzavřeny nádoby s chemikáliemi a jsou uložena na patřičné místo.
- Práce v chemické laboratoři je zakázána těhotným ženám a matkám do konce 9. měsíce po porodu. Posluchačka je povinna vedoucímu cvičení oznámit graviditu.

Všeobecné zásady bezpečnosti práce v laboratoři

- Provoz na všech pracovištích, kde se pracuje s látkami nebo přípravky škodlivými zdraví, musí být upraven tak, aby tyto látky nemohly ohrozit pracovníky na těchto pracovištích, ani v okolí pracoviště, aby neohrožovaly podzemní a povrchové vody a aby neunikaly do ovzduší v koncentraci škodící zdraví, tj. nesmí být překročeny nejvyšší přípustné koncentrace pro pracovní prostředí (NPK-P - Příloha 3) . Musí být rovněž zajištěny asanační prostředky pro případ havárie.
- Hlavní zásadou při práci se škodlivými látkami a přípravky je preventivně se vyvarovat všech možností vzniku otrav (vyloučit přímý kontakt pracovníků s těmito látkami), použít všech nezbytných ochranných prostředků (ochranných brýlí, rukavic, obličejových štítů, masek, atd.) a dodržovat všechny bezpečnostní předpisy.
- Při práci s látkami škodlivými zdraví není dovoleno jíst ani pít nebo kouřit. Před jídlem, pitím a kouřením v pracovních přestávkách a po skončení práce si musí pracovníci důkladně umýt ruce a obličej, podle povahy práce musí po jejím skončení provést důkladnou očistu celého těla. Pokud pracovník pracuje v ochranném oděvu, nesmí jíst ani pít po celou dobu, po kterou je v tomto obleku.
- Při rozsypání nebo rozlití škodlivé látky je nutno okamžitě zajistit její zneškodnění.
- Žiraviny nesmějí být přechovávány ve větší výšce, než je výše ramen pracovníka, který s nimi manipuluje (max. ve výšce 165 cm).
- Nádoby s kyselinami je třeba podložit miskou.
- Pro nalévání chemikálií (kyselin, louhů, žiravin apod.) ze skleněných balonů či demižonů se musí používat stojanů, do kterých se dají tyto nádoby bezpečně zavěsit a při vylévání do menších nádob naklánět. Tyto výkyvné stojany může nahradit násoskové zařízení nepůsobící přetlak. Pracovníci se musí ochránit štítem na obličej, gumovou zástěrou a gumovou obuví.
- Při zředování se vždy lije kyselina do vody a nikdy naopak. Kyselina se nalévá pomalu a opatrně, zvláště kyselina sírová.
- Při rozpouštění tuhého hydroxidu se musí sypat hydroxid po malých částech do vody za stálého míchání. Nikdy se nenalévá voda na hydroxid.
- Rozlitá kyselina dusičná se nesmí odstraňovat pilinami, hadry a jinými organickými látkami. Před odstraněním musí být zneutralizována a není-li to možné, tedy alespoň maximálně zředěna. Nádobí znečištěné organickými látkami se nesmí čistit kyselinou dusičnou (nebezpečí bouřlivých reakcí, vývin oxidů dusíku a samovznícení).
- Rozlité kyseliny, zejména koncentrované, je třeba nejprve opatrně zředit vodou, mírně zneutralizovat posypáním uhličitanem (např. soda, křída apod.) nebo polítm zředěnými roztoky alkálií, následuje opatrné spláchnutí vodou nebo tekutinu necháme vsáknout do pilin, hadrů, apod. Při asanaci je nutno dbát na to, aby se nezamořila příliš velká plocha.
- Rozlitá kyselina chloristá se musí silně zředit vodou a k setření se použije nehořlavý materiál, nikdy ne bavlněný nebo celulózový. Materiál, kterým byla kyselina chloristá stírána, je nutno ihned proprat v tekoucí vodě.
- Jakékoliv manipulace s látkami dýmavými, dráždivými, zápachajícími a toxickými plyny se smějí provádět jedině v digestoři.
- Tuhé chemikálie (např. pevný oxid uhličitý) se nesmí nikdy brát nechráněnou rukou.
- Žiravé, toxické a infekční kapaliny se smějí pipetovat jedině za použití bezpečnostních pipet, popř. sacího zařízení, které nedovolí vniknout kapalině do úst.
- Při všech manipulacích s látkami ve zkumavkách a otevřených nádobách musí být ústí nádob odvrácené od pracovníků do volného prostoru.
- Zátky lahví se nesmějí pokládat potřísněnou plochou na desku stolu (snížení možnosti poleptání, otravy a kontaminace).
- Spalování, popř. žihání látek se musí provádět jen v digestoři. Rovněž i vyvíjení sirovodíku, který je prudce jedovatý.
- Kyselinu chloristou je nutno uchovávat v lahvích se zabroušeným hrdlem a odděleně od ostatních chemikálií, zejména organických. Lahve s kyselinou chloristou se nesmějí pokládat na dřevěné regály, nýbrž na skleněné, porcelánové, keramické nebo jiné ohnivzdorné a jiné neabsorbující podložky, aby se stopy po rozlití mohly snadno odstranit.
- Pro práci se rtuťí platí oborová norma OPE 34 3689 (hladká pracovní plocha beze spár se zvýšeným okrajem, vaničky nebo misky mají být i pod přístrojem se rtuťí). Rtuť se nesmí splachovat do odpadu, ale musí být pečlivě sesbírána a její zbytky likvidovány zinkem nebo sírou.
- Chemické nádobí, které bylo použito pro práci s toxickými látkami nebo žiravinami, je nutné před dalším použitím dokonale vypláchnout. Obdobně musí být všechny lahve od toxických látek před jejich likvidací zbaveny zbytků obsahu.

První pomoc:

- při potřísnění kůže žiravinami nebo toxickou látkou zpravidla stačí odstranit oděv a opláchnout zasažené místo vodou, případně je možné následně provést neutralizaci zředěným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (potřísnění kyselinou) nebo kyseliny borité příp. octové (potřísnění zásadou),
- při kontaktu ústní sliznice s žiravinou nebo toxickou látkou je nutné opakovaně vypláchnout ústa vodou, při požití pak vypít nejméně ½ litru vody, vyvolat zvracení a dostavit se k lékařskému ošetření,
- při kontaktu oka s žiravinou nebo toxickou látkou rozevřít násilím oční víčko a **ihned** provést intenzivní výplach oka silným proudem vody (pomocí hadice nasazené na vodovodním kohoutku nebo bezpečnostní sprchy) alespoň po dobu 10 minut, dostavit se k lékařskému ošetření,
- při nadýchání se toxické látky okamžitě přerušit expozici, vyhledat přísun čerstvého vzduchu, případně se dostavit k lékařskému ošetření,
- drobná poranění (pořezání sklem, popáleniny) lze ošetřit na místě (krvácející poranění je nutné vydezinfikovat), větší zranění ošetří lékař.

Každý úraz je nutné neprodleně oznámit vedoucímu cvičení, který provede záznam o úrazu a jeho ošetření do deníku bezpečnosti práce.

Důležitá telefonní čísla:

záchranná služba - 155
hasiči - 150
tísňové volání - 112

Použitá a doporučená literatura:

- Ferenčík M., Škárka B.: Biochemické laboratorne metódy, Alfa/SNTL 1981
Harper H.A.: Přehled fyziologické chemie, Avicenum 1977
Karlson P.: Základy biochemie, Academia 1981
Káš J. a kol.: Laboratorní cvičení z biochemie, Nakladatelství Olomouc 2000
Kováč G., Hejda B., Lichnovská M.: Klinická biochemie II, Avicenum 1986
Mikeš V.: Základní biochemické praktikum, MU Brno 1992
Šantavý F. a kol.: Biochemie, Avicenum 1975
Škárka B., Ferenčík M.: Biochémiá, Alfa/SNTL 1987
Vodrážka Z., Krechl J.: Bioorganická chemie, SNTL Praha 1991
Zýka J. a kol.: Analytická příručka, SNTL/Alfa 1988