



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalaurų rengimui**

BIO 323. BIOFIZIKA

Laboratorinis darbas

TRANSMEMBRANINIAI POTENCIALAI. NERNSTO LYGTIS

DARBO TIKSLAS:

Susipažinti su transmembraninio potencialo susidarymu, kai pro membraną gali praeiti tik vieno tipo jonai.

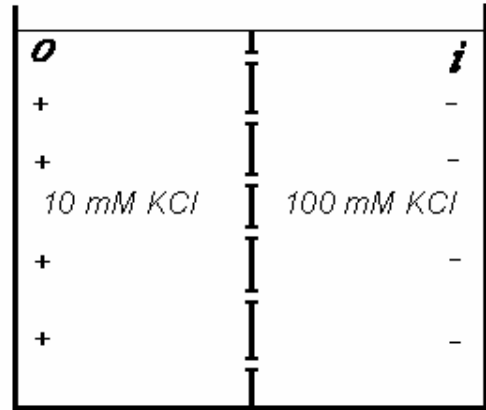
DARBO UŽDUOTYS:

1. Išmatuoti potencialų skirtumą (transmembraninį potencialą), susidarantį tarp dviejų skirtingų kalio jonų koncentracijų tirpalų, atskirtų membrana, pralaidžia tik kalio jonams.
2. Išmatuoti potencialų skirtumą, susidarantį tarp dviejų skirtingų vandenilio jonų koncentracijų tirpalų, atskirtų membrana, pralaidžia tik vandenilio jonams.
3. Patikrinti, ar šios potencialų skirtumo (transmembraninio potencialo) priklausomybės nuo kalio ir vandenilio jonų koncentracijų skirtumo tenkina Nernsto lygtį.

TEORIJA:

Transmembraninis potencialas paprastos jonų pusiausvyros atveju (Nernsto-Donano potencialas)

Tegul turime indą su dviem elektrolito tirpalais, perskirtą pusiau pralaidžia pertvara, praleidžiančia tik katijonus, mūsų atveju kalio jonus (1 pav.). Tai, pavyzdžiui, gali būti membrana su didele fiksuotų neigiamų jonų koncentracija ar su atrankiais jonų kanalais. Kalio jonų atveju, tai gali būti gramacidino molekulės, formuojančios atrankų kalio jonams kanalą. Tokiu atveju anijonų judrumas membranoje yra lygus nuliui.



1 pav. Transmembraninio potencialo susidarymo schema.

Tegu kairėje indo pusėje tirpalo koncentracija yra mažesnė nei dešinėje. Panašią situaciją turime daugumos ląstelių atveju; dešinysis tirpalas panašus ląstelės vidinę terpę, kurioje yra didesnė kalio jonų koncentracija, o kairysis - išorinį tirpalą, kur kalio jonų koncentracija mažesnė. Tokiu atveju, katijonai difunduos iš dešinės pusės į kairiąją pagal koncentracijos gradientą. Katijonų srautas, sukeltas koncentracijų skirtumo, priklauso nuo koncentracijos gradiento ir bus pastovus laikui bėgant, nes maži, pro membraną praėjusių jonų kiekiai jų koncentracijų praktiškai nekeičia (žiūr. žemiau).

Tačiau jonų difuzija nevyks visą laiką. Kiekvienas katijonas, perėjęs iš dešinės indo pusės į kairiąją, perneša ir teigiamą krūvį, tuo tarpu dešiniojoje pusėje lieka nesukompensuoti neigiami anijonų, negalinčių praeiti pro membraną, krūviai. To pasekoje, kairioji indo pusė įsielektrins teigiamai, o dešinioji - neigiamai. Dėl susidariusio potencialų skirtumo atsiradęs elektrinis laukas sukuria teigiamų katijonų elektrodifuziją iš kairiosios indo pusės į dešiniąją, t.y. priešinga nei tų jonų srautas, sukeltas koncentracijų skirtumo, kryptimi.

Šis katijonų srautas yra proporcingas potencialų skirtumui. Kuo daugiau katijonų pereina iš dešinės indo pusės į kairiąją, tuo didesnis susidaro potencialų skirtumas. Taigi, didėja ir atgalinis (iš kairės pusės į dešiniąją) elektrodifuzinis katijonų srautas. Potencialų skirtumas didėja tol, kol atgalinis elektrodifuzinis katijonų srautas susilygina su jonų srautu, sukeltu koncentracijų skirtumo.

Rasime lygtį, aprašančią susidariusį potencialų skirtumą. Tegul turime du skirtingų koncentracijų KCl tirpalus (10 ir 100 mM), kurie perskirti pralaidžia katijonams (mūsų atveju kalio jonams) membrana. Po tam tikro laiko nusistovės pusiausvyra. Tam, kad supaprastinti

analizę, prie didesnės koncentracijos tirpalo pridedame papildomą hidrostatinį slėgį, kad nebūtų vandens transporto dėl osmosinių slėgių skirtumo.

Pusiausvyros būsenoje kalio jonų elektrocheminis potencialas turi būti vienodas abiejuose tirpaluose:

$$\mu_{o0} + RT \ln a_o + zF\varphi_0 = \mu_{oi} + RT \ln a_i + zF\varphi_i \quad (1)$$

Čia indeksai o ir i reiškia skirtingas fazes (i - koncentruotas tirpalas, o - atskiestas tirpalas), R - dujų pastovioji, T – absoliutinė temperatūra, F -Faradėjaus skaičius, z - jonų valentingumas, atsižvelgiant ir į jų kruvio ženklą, a - jonų aktingumas ($a = fc$, kur f - aktingumo koeficientas, c - jonų koncentracija).

Kadangi tirpiklis abiejose pusėse yra tas pats (vanduo), tai $\mu_{o0} = \mu_{oi}$ ir iš (1) lygties seka:

$$\varphi_i - \varphi_0 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_o}{a_i} = 2,303 \frac{RT}{zF} \lg \frac{a_o}{a_i} \quad (2)$$

Jeigu laikome, kad aktingumo koeficientai abiejuose tirpaluose vienodi, tai

$$\varphi_i - \varphi_0 = 2,303 \frac{RT}{zF} \lg \frac{c_o}{c_i} \quad (3)$$

Lygtis (8.3) vadinama **Nernsto lygtimi**. Iš jos matyti, kad potencialų skirtumas, susidaręs tarp abiejų membranos pusių, (transmembraninis potencialas) priklauso nuo temperatūros ir jonų, galinčių pereiti pro membraną, koncentracijos gradiento. Akivaizdu, kad nesant koncentracijų gradiento, transmembraninis potencialas bus lygus nuliui.

Beje, lygtį (3), aprašančią susidariusio transmembraninio potencialo $E_m = \varphi_i - \varphi_o$ priklausomybę nuo jonų koncentracijų santykio, taip pat galima rasti iš Hendersono lygties, aprašančios difuzinį potencialų skirtumą. Tereikia atsižvelgti į tai, kad anijonų judrumas membranoje lygus nuliui.

Įstačius į lygtį (3) konstantų R , F ir T vertes, gauname, kad teigiamiems vienvalečiams jonams ($z = +1$), esant 20 °C temperatūrai:

$$E_M = 0,058 \lg \frac{c_o}{c_i} \quad (4)$$

Iš čia seka, kad mūsų nagrinėjamoje sistemoje ($c_o=10$ mM ir $c_i=100$ mM), pusiausvyrinis potencialų skirtumas (Nernsto-Donano potencialas) bus -58.2 mV.

Galima apskaičiuoti, koks krūvis turi pratekėti pro dirbtinę bisluoksnę lipidinę membraną, kad susidarytų tam tikras potencialų skirtumas. Imame $\Delta\varphi = 100$ mV, $S_m=1$ mm, $C_m=1$ μ F/cm. Tada $Q= 10^{-9}$ C, kas atitinka 10^{-14} molio vienvalečių jonų. Tokio mažo kiekio jonų tiesiogiai eksperimentiškai aptikti praktiškai neįmanoma.

DARBO PRIEMONĖS:

1. pH-metras InoLab 730;
2. Magnetinė maišyklė;
3. Mini atrankus K^+ ir lyginamasis elektrodai (Microelectrodes, Inc., Bedfordas, NH, JAV);
4. Mini kombinuotas pH elektrodas Microelectrodes, Inc., Bedfordas, NH, JAV);
5. Stiklinės 50, 100 ml talpos;
6. Matavimo kolba 25 ml.

MEDŽIAGOS, REAGENTAI, TIRPALAI:

1. 1 M KCl tirpalas;
2. Druskos rūgštis tirpalas, 0,1 mol/l;
3. Glicino (NH_2CH_2COOH) tirpalas, 0,1 mol/l;
4. Natrio citrato tirpalas, 0,1 mol/l;
5. Natrio šarmo tirpalas 0,1 mol/l;
6. Kalio dihidrofosfato tirpalas;
7. Dinatrio fosfato tirpalas;
8. Natrio tetraborato tirpalas.

DARBO EIGA:

1 BANDYMAS. *Potencialų skirtumo, susidarančio tarp dviejų tirpalų, atskirtų membrana, pralaidžia tik kalio jonams, tyrimas.*

DARBO EIGA

1. Įjungiamo jonometrą ir leidžiame jam šilti 10 minučių. Pajungiame atrankinį kalio jonų bei palyginimo elektrodus. Prietaisas paruoštas matavimui.

2. Iš KCl tirpalo paruošiama po 25 ml dešimt įvairių koncentracijų KCl tirpalų 10^{-5} – 10^{-1} mol/l ribose.

3. Į stiklinę su paruoštu tirpalu įleidžiami atrankinis kalio jonų ir palyginimo elektrodai, įjungiama maišyklė ir po 2 min registruojami jonometro rodmenys. Tai atliekama su visais paruoštais KCl tirpalais. Matavimai pradami nuo mažiausios kalio jonų koncentracijos tirpalų.

Prieš panardinant elektrodus į naują tirpalą, jie kruopščiai nuplaunami distiliuotu vandeniu ir **atsargiai (!)** nusausinami filtro popieriumi.

4. Gautas potencialų skirtumo vertes įrašome į lentelę 1.

Lentelė 1. Transmembraninio potencialo tyrimas. Membrana pralaidi tik kalio jonams.

c_K , mol/l										
Tirpalo pK										
Ekspirimentinis potencialas, mV										
Teorinis potencialas, mV										

5. Gautą eksperimentinę transmembraninio potencialo priklausomybę nuo vandenilio jonų koncentracijos pavaizduojame grafiškai, abscisių ašyje atidėdami tirpalo pK vertes, o ordinačių - išmatuotą transmembraninį potencialą. Gauti eksperimentiniai taškai aproksimuojami tiese, kuri nubrėžiama mažiausiu kvadratų metodu.

6. Naudojantis Nernsto lygtimi (3) apskaičiuojama teorinė transmembraninio potencialo priklausomybė nuo KCl tirpalo koncentracijos (atrankinio kalio jonų elektrodo vidus užpildytas 0,1 M KCl tirpalu).

7. Gauti eksperimentiniai duomenys palyginami su teoriniais:

a) įvertinamas tiesiškumas ir

b) tiesės lygties polinkio kampas palyginamas su koeficientu, stovinčiu Nernsto lygtyje prieš logaritmo ženklą.

2 BANDYMAS. Nernsto lygties tyrimas pH elektrodu.

DARBO EIGA

1. Įjungiamo pH-metrą ir leidžiame jam šilti 10 minučių. Pajungiame stiklo bei palyginimo (kalomelio) elektrodus. Prietaisas paruoštas matavimui.

2. Paruošiama po 25 ml dešimties skirtingų H^+ koncentracijų (pH) tirpalų (žr. Priedą 1). Kokių H^+ koncentracijų tirpalus ruošti, nurodo dėstytojas.

3. Į stiklinę su paruoštu tirpalu įleidžiami kmbinuotas pH elektrodas, įjungiamo maišyklė ir po 20 s registruojami jonometro rodmenys. Tai atliekama su visais paruoštais buferiniais tirpalais. Matavimai pradedami nuo mažiausios vandenilio jonų koncentracijos tirpalo. Prieš panardinant elektrodus į naują tirpalą, jie kruopščiai nuplaunami distiliuotu vandeniu ir **atsargiai (!)** nusausinami filtro popieriumi.

4. Gautas potencialų skirtumo vertes įrašome į lentelę 2.

Lentelė 2. Eksperimentinė potencialų skirtumo priklausomybė nuo H^+ jonų koncentracijos.

Tirpalo pH										
Potencialas, mV										

5. Gautą eksperimentinę potencialo priklausomybę nuo vandenilio jonų koncentracijos pavaizduojame grafiškai, abscisių ašyje atidėdami buferinio tirpalo pH vertes, o ordinačių - išmatuotą celių elektrovaros jėgą. Gauti eksperimentiniai taškai aproksimuojami tiese, kuri nubrėžiama mažiausiu kvadratų metodu.

6. Gauti eksperimentiniai duomenys palyginami su teoriniais:

a) įvertinamas tiesiškumas ir

b) tiesės lygties polinkio kampas palyginamas su koeficientu, stovinčiu Nernsto lygtyje prieš logaritmo ženklą.

7. Palyginame abėjuose bandymuose gautas eksperimentines priklausomybes, įvertiname jų tiesiškumą.

8. Padarome išvadas.

KONTROLINIAI KLAUSIMAI:

1. Transmembraninio potencialo kilmė paprastos jonų pusiausvyros atveju (Nernsto-Donano potencialas);
2. Nuo ko ir kaip priklauso transmembraninio potencialo dydis.

LITERATŪRA:

- 1) G. Saulis, „Biofizikos paskaitų konspektas“, Kaunas, 2005.
- 2) R. Glazer, Biophysics. – Berlin: Springer Verlag, 2001. - 361 p.
- 3) Н И. Губанов, А. А. Утепбергенов, Медицинская биофизика, М.: Медицина, 1978, с. 168-171.
- 4) А. Г. Стромберг, Д. П. Семенка, Физическая химия, М.: Высш. шк., 1988, с. 262-266.

PRIEDAS.

Buferiniai tirpalai (**pH nuo 1,1 iki 12,9**, esant 20 °C temperatūrai).

Pradiniai tirpalai:

1 tirpalas - druskos rūgšties tirpalas, 0,1 mol/l.

2 tirpalas - glicino ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) tirpalas, 0,1 mol/l. Ištirpinama 7,507 g glicino, 5,85 g NaCl ir vieno litro matavimo kolboje distiliuotuoju vandeniu praskiedžiama iki brūkšnio.

3 tirpalas - natrio citrato tirpalas, 0,1 mol/l. Ištirpinama 21,014 g citrininės rūgšties ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 200 ml 1 mol/l NaOH ir vieno litro matavimo kolboje distiliuotuoju vandeniu praskiedžiama iki brūkšnio.

4 tirpalas - natrio šarmo tirpalas 0,1 mol/l.

5 tirpalas - kalio dihidrofosfato tirpalas. Ištirpinama 9,073 g KH_2PO_4 ir vieno litro matavimo kolboje distiliuotuoju vandeniu praskiedžiama iki brūkšnio.

6 tirpalas - dinatrio fosfato tirpalas. Ištirpinama 11,866 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ir vieno litro matavimo kolboje distiliuotuoju vandeniu praskiedžiama iki brūkšnio.

7 tirpalas - natrio tetraboratas. Ištirpinama 12,367 g boro rūgšties (H_3BO_3) 100 ml 1N NaOH ir vieno litro matavimo kolboje distiliuotuoju vandeniu praskiedžiama iki brūkšnio.

Buferiniai tirpalai pH 1,1-4,9 ($\text{HCl} - \text{NaH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)

Tirpalai ruošiami, imant nurodytus 3-iojo tirpalo tūrius ir praskiedžiant matavimo kolboje 1-uuju tirpalu iki 25 ml (lentelė 3.3).

Lentelė 3.3. 3 tirpalo tūriai, reikalingi paruošti 25 ml buferinio tirpalo, kurio pH 1,1-4,9.

pH	1,1	1,3	1,5	1,7	1,9	2,0	2,1	2,3	2,5	2,7	2,9	3,0
3-iojo tirpalo tūris, ml	1,2	4,0	5,5	6,6	7,4	7,65	7,9	8,4	8,85	9,3	9,8	10,1

pH	3,1	3,3	3,5	3,7	3,9	4,0	4,1	4,3	4,5	4,7	4,9
3-iojo tirpalo tūris, ml	10,4	11,0	11,7	12,5	13,4	14,0	14,6	16,1	18,0	20,6	23,9

Buferiniai tirpalai pH 5,0-8,0 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$)

Tirpalai ruošiami, imant nurodytus 6-ojo tirpalo tūrius ir praskiedžiant matavimo kolboje 5-uoju tirpalu iki 25 ml (lentelė 3.4).

Lentelė 3.4. 6-ojo tirpalo tūriai reikalingi paruošti 25 ml buferinio tirpalo, kurio pH 5,0-8,0.

pH	5,0	5,1	5,3	5,5	5,7	5,9	6,0	6,1	6,3	6,5	6,7	6,9
6-ojo tirpalo tūris, ml	0,24	0,34	0,58	1,0	1,55	2,45	3,0	3,75	5,55	7,85	10,7	13,9

pH	7,0	7,1	7,3	7,5	7,7	7,9	8,0
6-ojo tirpalo tūris, ml	15,3	16,75	19,45	21,3	22,8	23,9	24,2

Buferiniai tirpalai pH 7,7-9,1 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 - \text{HCl}$)

Tirpalai ruošiami, imant nurodytus 7-ojo tirpalo tūrius ir praskiedžiant matavimo kolboje 1-uoju tirpalu iki 25 ml (lentelė 3.5).

Lentelė 3.5. 7-ojo tirpalo tūriai, reikalingi paruošti 25 ml buferinio tirpalo, kurio pH 7,7-9,1.

pH	7,7	7,9	8,0	8,1	8,3	8,5	8,7	8,9	9,0	9,1
7-ojo tirpalo tūris, ml	13,1	13,7	13,9	14,3	15,2	16,4	17,8	20,15	21,4	23,0

Buferiniai tirpalai pH 8,7-12,9

($\text{NH}_2\text{CHCOOH} - \text{NaOH}$)

Tirpalai ruošiami, imant nurodytus 4-ojo tirpalo tūrius ir praskiedžiant matavimo kolboje 2-uoju tirpalu iki 25 ml (3.6 lentelė).

Lentelė 3.6. 4-ojo tirpalo tūriai, reikalingi paruošti 25 ml buferinio tirpalo, kurio pH 8,7-12,9.

pH	8,7	8,9	9,0	9,1	9,3	9,5	9,7	9,9	10,0	10,1	10,3	10,5	10,7	10,9
4-ojo tirpalo tūris, ml	1,8	2,6	3,1	3,65	4,95	6,3	7,75	9,05	9,6	10,3	10,9	11,4	11,85	12,15

pH	11,0	11,1	11,3	11,5	11,7	11,9	12,0	12,1	12,3	12,5	12,7	12,9
4-ojo tirpalo tūris, ml	12,25	12,35	12,55	12,75	13,0	13,35	13,6	13,95	14,8	16,35	18,75	22,5