



kampus Bohunice



úvodní cvičení – sestavení kalibrační přímky pro stanovení koncentrace hexakynoželezitanu draselného

koncentrace hexakynoželezitanu
draselného :

1 = 0,0 mmol/l (slepý vzorek)

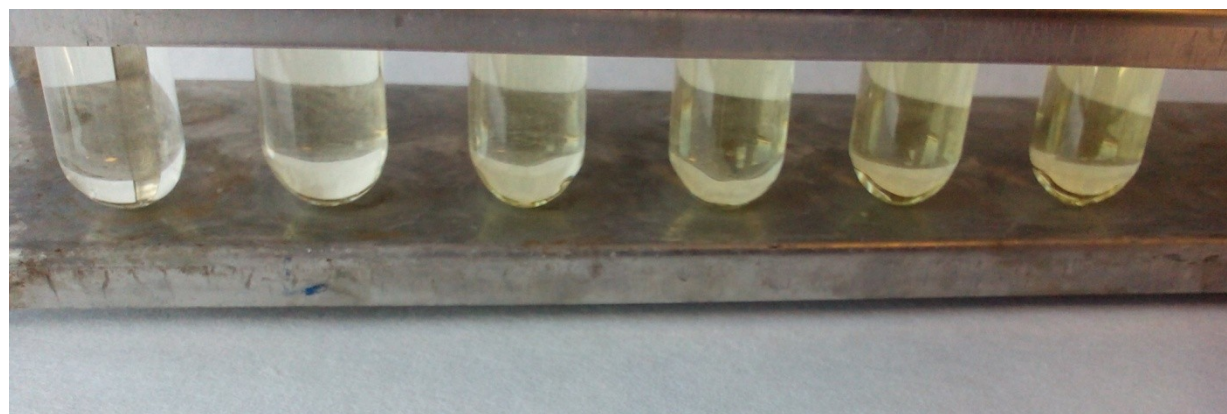
2 = 0,1 mmol/l

3 = 0,2 mmol/l

4 = 0,3 mmol/l

5 = 0,4 mmol/l

6 = 0,5 mmol/l



fotometrické stanovení

A_{420}

1

2

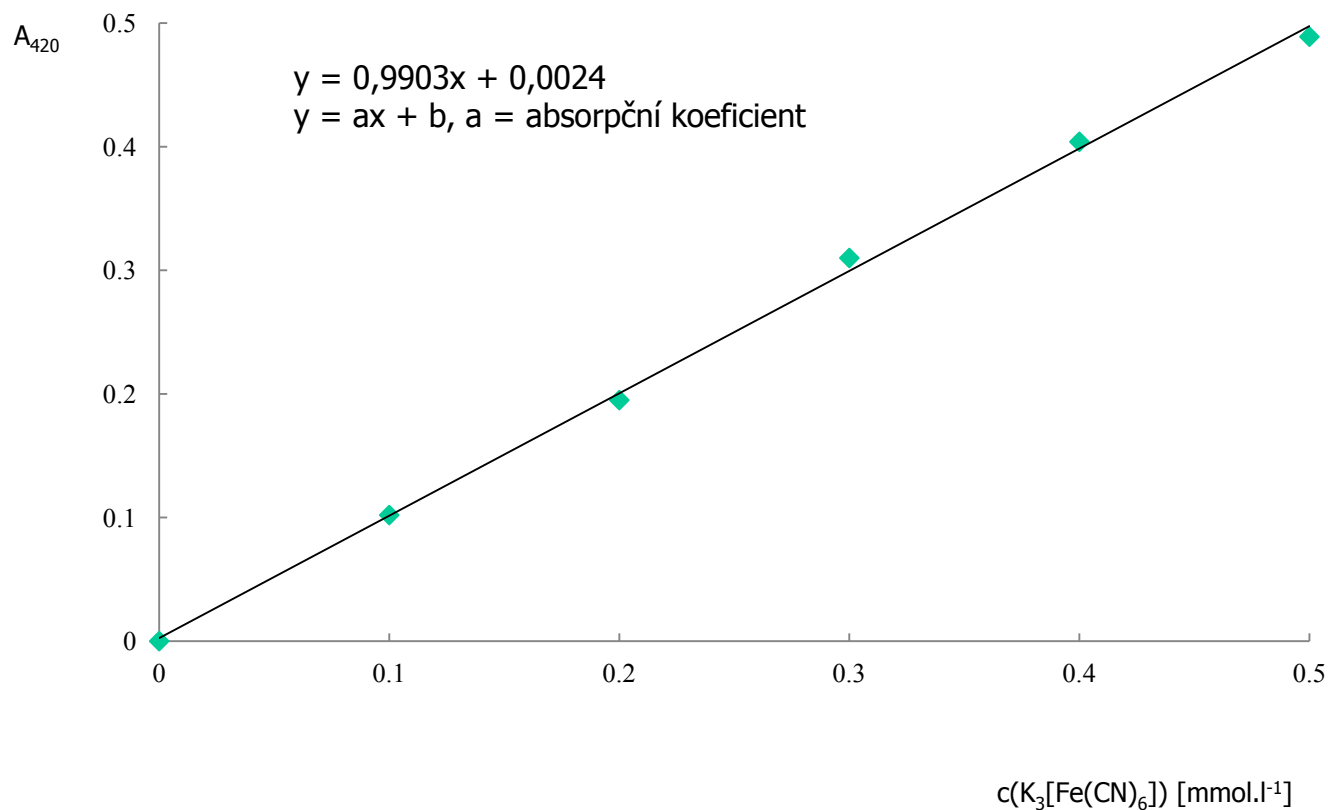
3

4

5

6

úvodní cvičení – sestavení kalibrační přímky pro stanovení koncentrace hexakynoželezitanu draselného



úloha č. 1 - kvalitativní stanovení sacharidů – thymolová reakce

1 = arabinosa

2 = ribosa

3 = glukosa

4 = galaktosa

5 = fruktosa

6 = sacharosa

7 = trehalosa

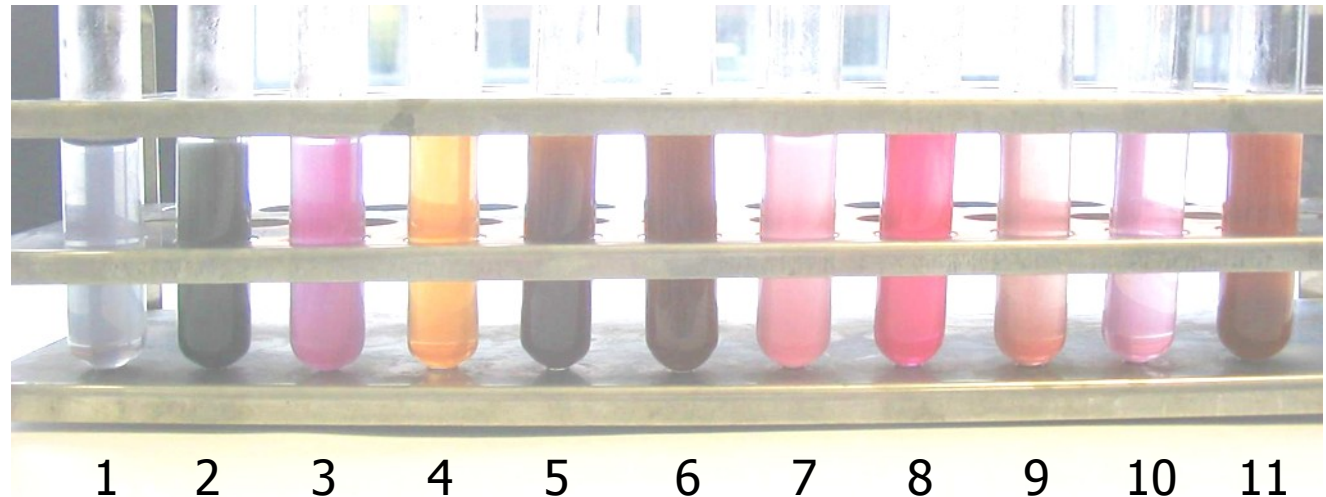
8 = maltosa

9 = laktosa

10 = cellobiosa

11 = rafinosa

pozitivní reakci poskytují všechny sacharidy, reakční produkty se liší zbarvením



úloha č. 1 - kvalitativní stanovení sacharidů – Fehlingova reakce

1 = arabinosa

2 = ribosa

3 = glukosa

4 = galaktosa

5 = fruktosa

6 = sacharosa

7 = trehalosa

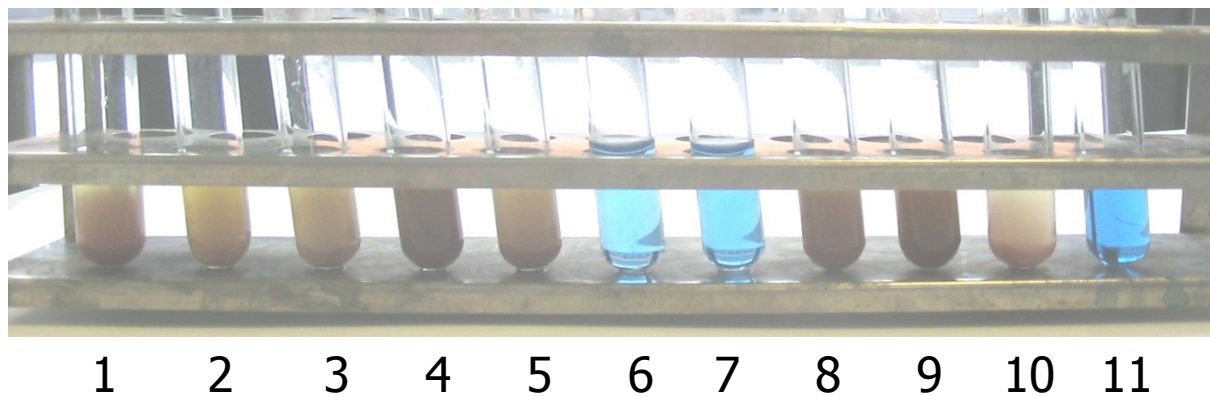
8 = maltosa

9 = laktosa

10 = cellobiosa

11 = rafinosa

pozitivní reakci poskytují redukující sacharidy, reakční produkty jsou tmavě zbarvené – hnědorezavý odstín vyredukované mědi (negativní reakce – světle modré zbarvení)



úloha č. 1 -kvalitativní stanovení sacharidů – Somogyiho reakce

1 = arabinosa

2 = ribosa

3 = glukosa

4 = galaktosa

5 = fruktosa

6 = sacharosa

7 = trehalosa

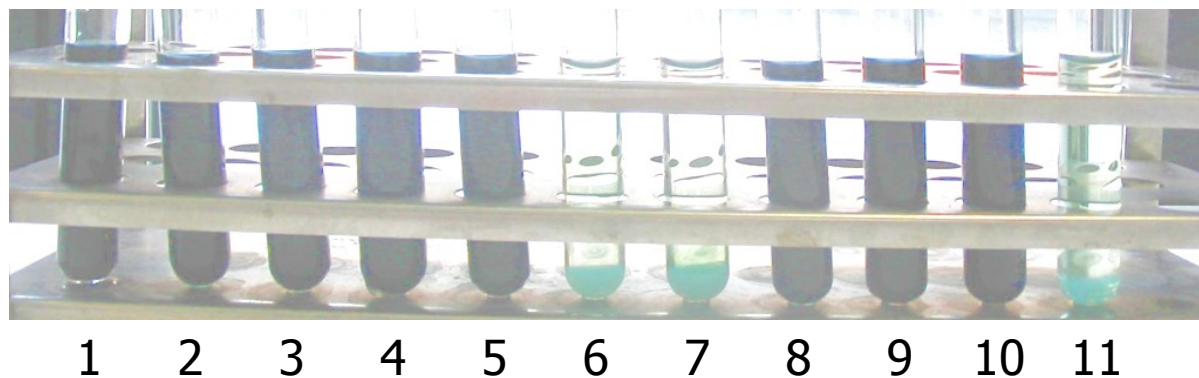
8 = maltosa

9 = laktosa

10 = cellobiosa

11 = rafinosa

pozitivní reakci poskytují redukující sacharidy, reakční produkty jsou tmavě zbarvené, modrý až zelenomodrý odstín (negativní reakce – světle modré zbarvení)



úloha č. 1 - kvalitativní stanovení sacharidů – Bialova reakce

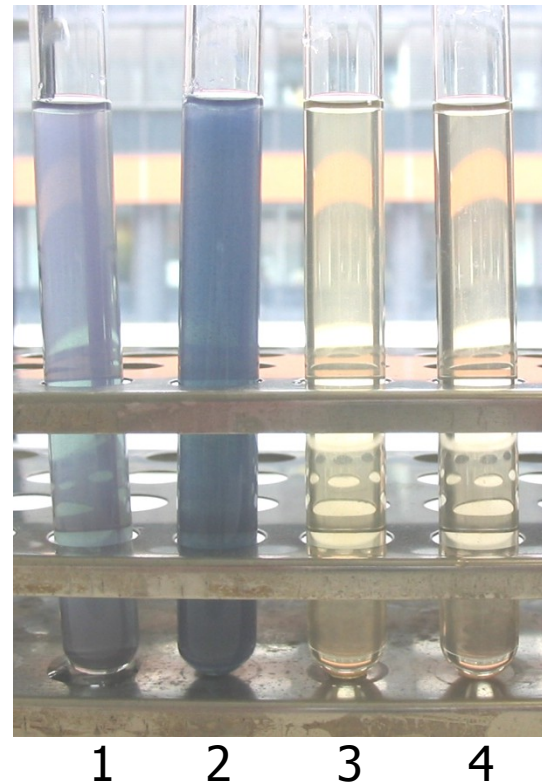
pozitivní reakci poskytují pentózy, reakční produkty jsou modře až modrozeleně zbarvené

1 = arabinosa

2 = ribosa

3 = glukosa

4 = galaktosa



úloha č. 1 - kvalitativní stanovení sacharidů – Selivanova reakce

pozitivní reakci poskytují ketózy resp. sacharidy obsahující podjednotku s ketózovou strukturou, reakční produkty jsou červeně zbarvené

1 = glukosa

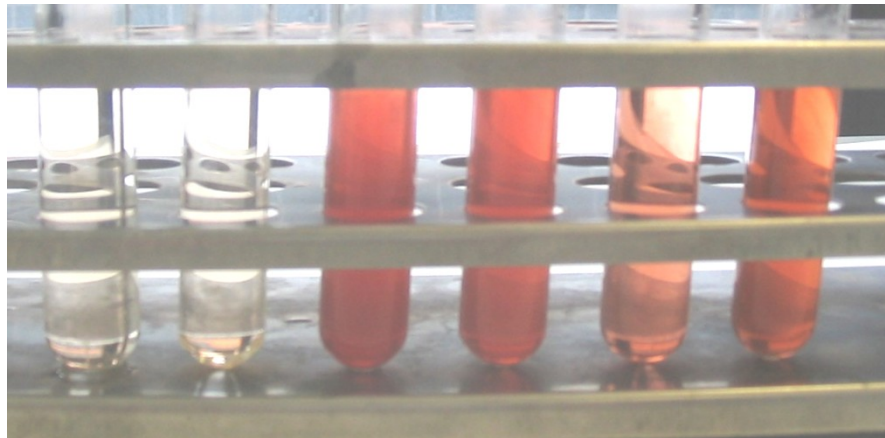
2 = galaktosa

3 = fruktosa

4 = sacharosa

5 = rafinosa

6 = inulin



1

2

3

4

5

6

kvalitativní stanovení sacharidů – Rothenfusserova reakce

pozitivní reakci poskytují ketózy resp. sacharidy obsahující podjednotku s ketózovou strukturou, reakční produkty jsou tmavomodře zbarvené

- 1 = glukosa
- 2 = galaktosa
- 3 = fruktosa
- 4 = sacharosa
- 5 = rafinosa
- 6 = inulin

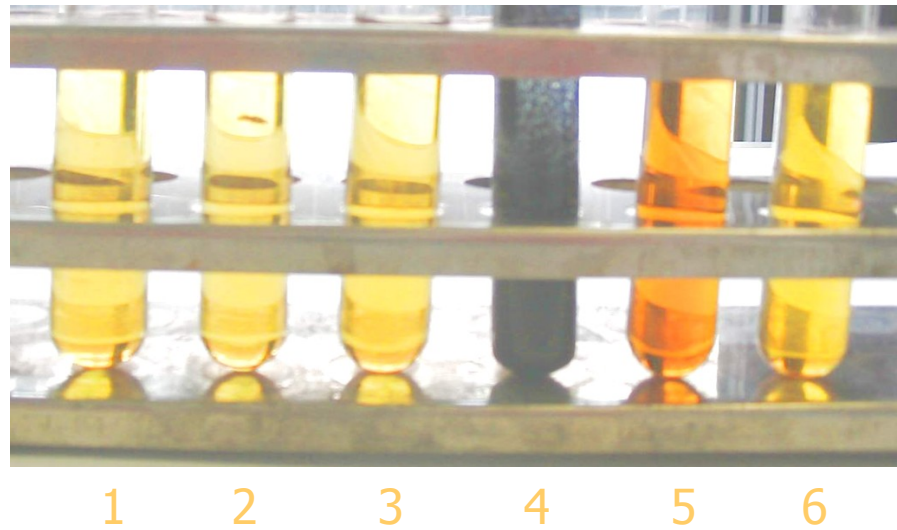


1 2 3 4 5 6

úloha č. 1 - kvalitativní stanovení sacharidů – reakce s jódem

pozitivní reakci poskytují polysacharidy, barva reakčních produktů je tím tmavší, čím delší jsou polysacharidové řetězce

- 1 = glukosa
- 2 = galaktosa
- 3 = fruktosa
- 4 = škrob
- 5 = glykogen
- 6 = inulin



úloha č. 1 - rozdělovací chromatografie sacharidů

(vyvíjení chromatogramu v chromatografické komůrce)

Silufol



mobilní fáze

úloha č. 1 - rozdělovací chromatografie sacharidů

(vyvíjení chromatogramu pod infralampou)

- 1 = ribosa
- 2 = 2'-deoxyribosa
- 3 = glukosa
- 4 = galaktosa
- 5 = mannososa
- 6 = fruktosa
- 7 = maltosa
- 8 = laktosa
- 9 = cellobiosa

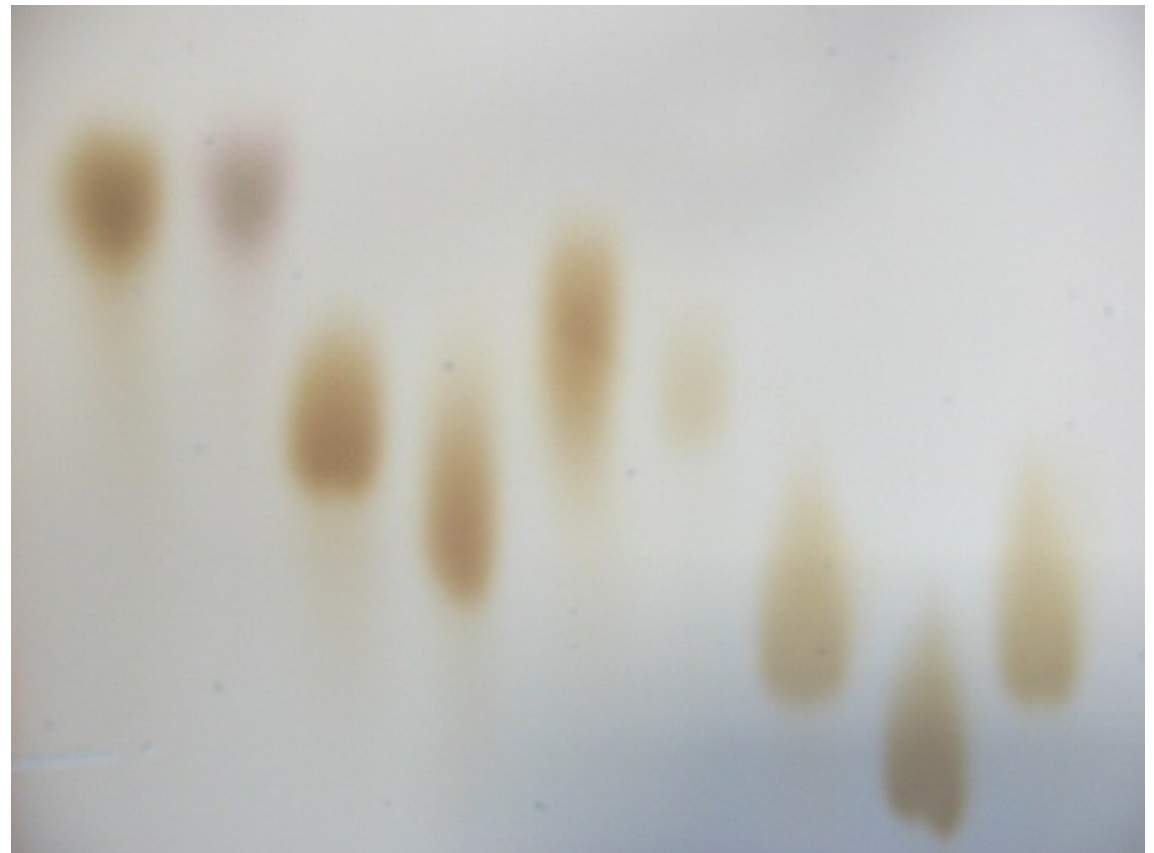


1 2 3 4 5 6 7 8 9

úloha č. 1 - rozdělovací chromatografie sacharidů

(hotový chromatogram)

- 1 = ribosa
- 2 = 2'-deoxyribosa
- 3 = glukosa
- 4 = galaktosa
- 5 = manna
- 6 = fruktosa
- 7 = maltosa
- 8 = laktosa
- 9 = cellobiosa



1 2 3 4 5 6 7 8 9

úloha č. 1 - rozdělovací chromatografie sacharidů

interpretace chromatogramu:

Všechny sacharidy jsou silně polární sloučeniny (přítomnost –OH skupin), jako dělicí faktory se uplatňuje počet –OH skupin a současně velikost molekuly (molekulová hmotnost). Polarita molekuly se dále uplatňuje v rámci jednotlivých skupin sacharidů lišících se molekulovou hmotností (pentózy vs. hexózy vs. disacharidy).

úloha č. 1 - kvantitativní stanovení redukcujících sacharidů (Somogyiho – Nelsonova reakce)

koncentrace glukosy:

1 = 0,00 mmol/l (slepý vzorek)

2 = 0,02 mmol/l

3 = 0,04 mmol/l

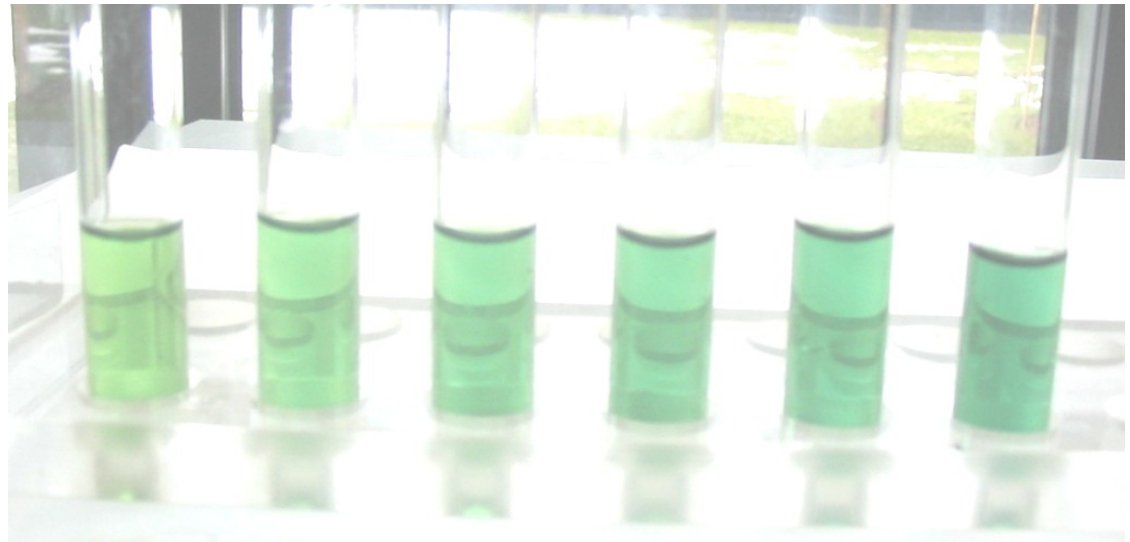
4 = 0,06 mmol/l

5 = 0,08 mmol/l

6 = 0,10 mmol/l

fotometrické stanovení

A_{740}



1

2

3

4

5

6

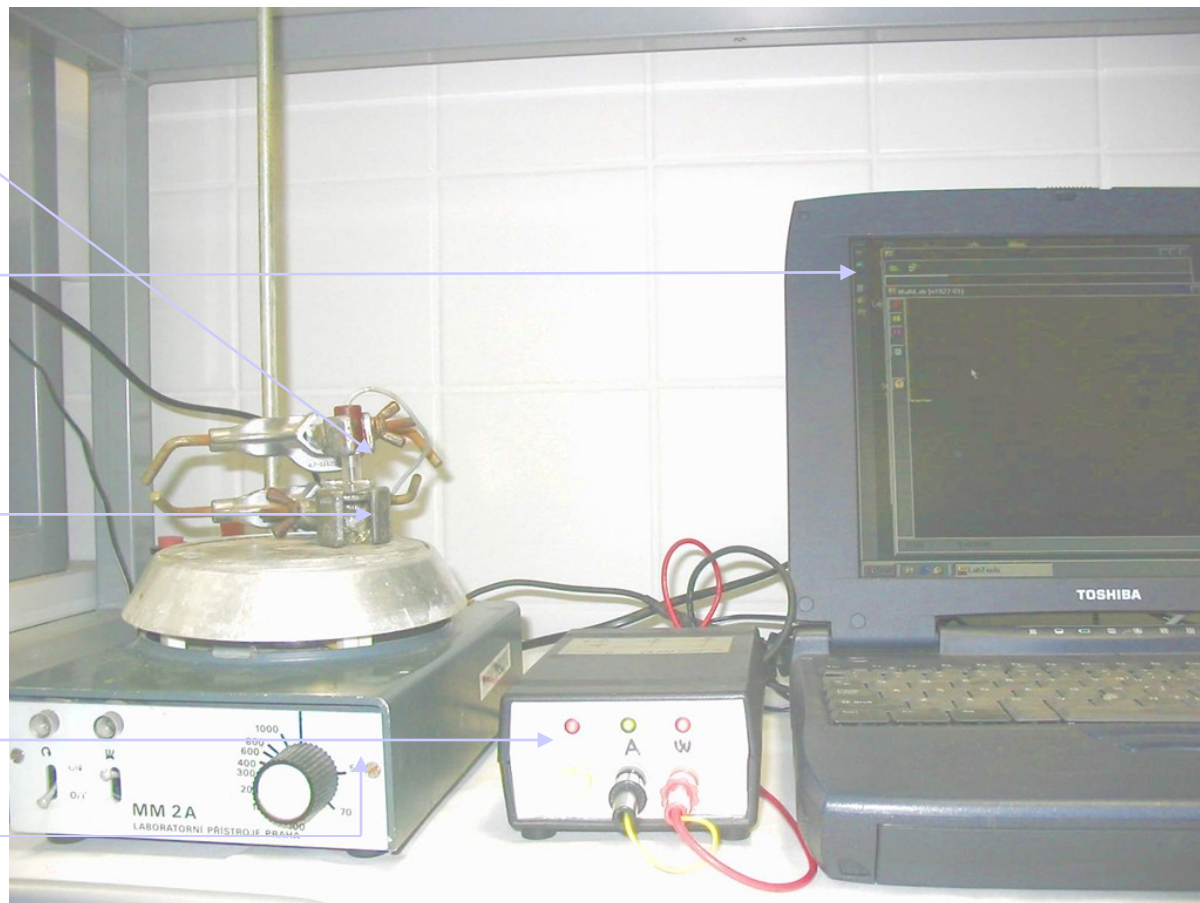
úloha č. 1 - glukosaoxidasová elektroda (měřicí systém)

elektroda

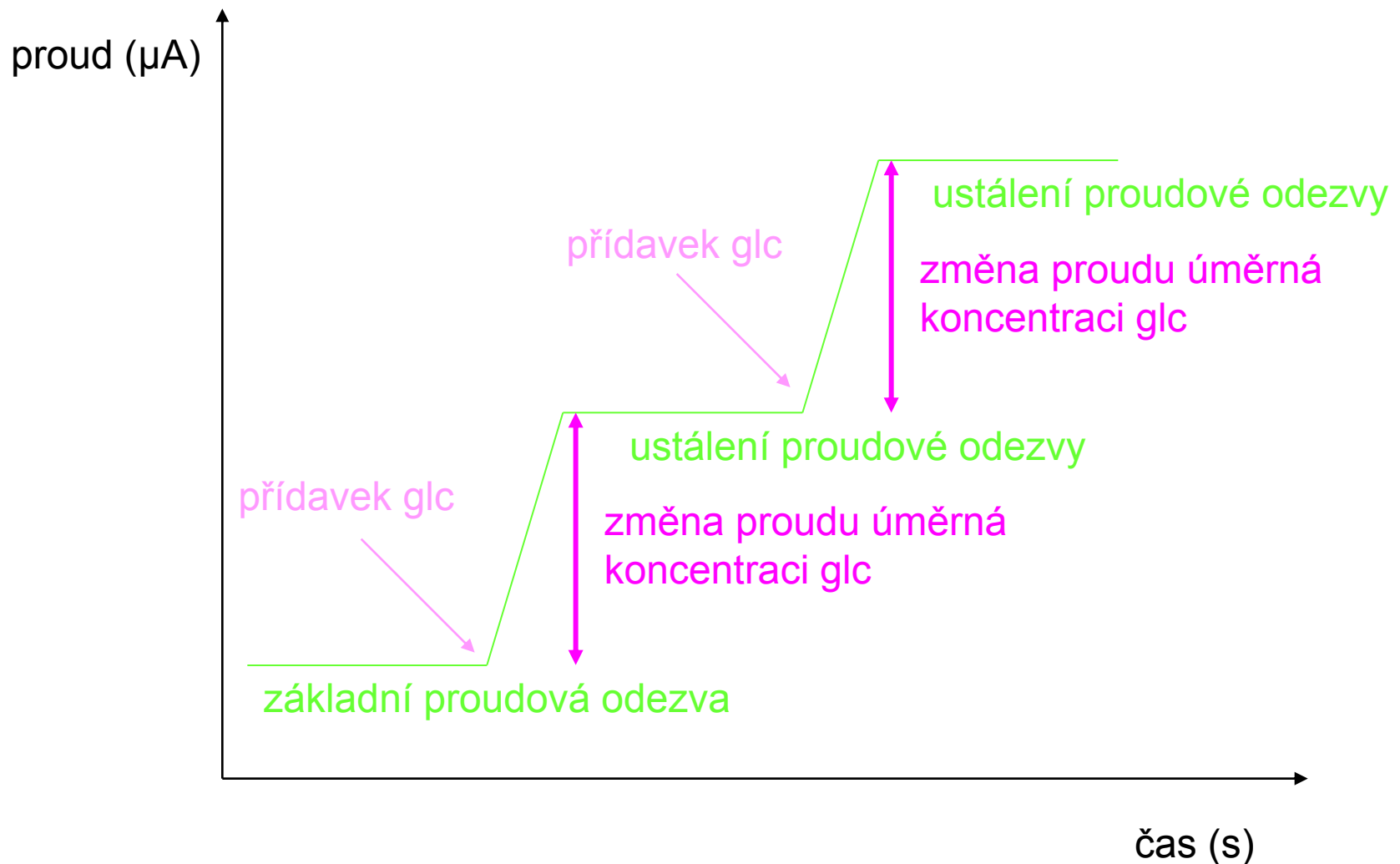
notebook

nádobka s
pracovním
pufrem

převodník
míchačka



úloha č. 1 - gluksooxidasová elektroda (stanovení koncentrace glukosy - záznam proudové odezvy)



úloha č. 2 - kvalitativní stanovení aminokyselin – Sakaguchiho reakce

BSA obsahuje všechny aminokyseliny a proto poskytuje pozitivní reakci, červené zbarvení reakčního produktu argininu

1 = arginin

2 = histidin

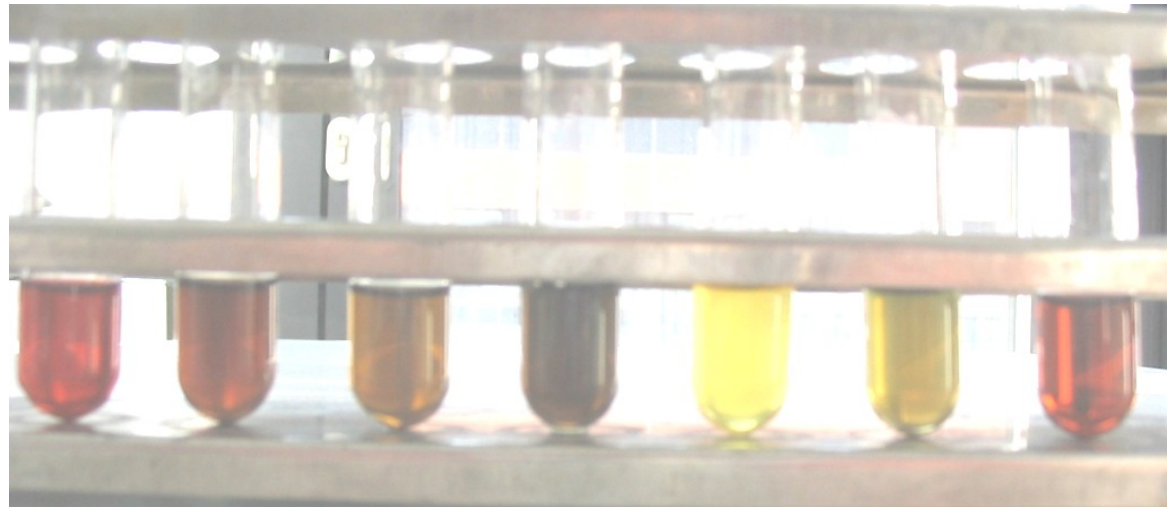
3 = tyrosin

4 = tryptofan

5 = cystein

6 = methionin

7 = BSA



1

2

3

4

5

6

7

úloha č. 2 - kvalitativní stanovení aminokyselin – xanthoproteinová reakce

BSA obsahuje všechny aminokyseliny a proto poskytuje pozitivní reakci, žluté až žlutočervené zbarvení reakčního produktu tyrosinu a tryptofanu

1 = arginin

2 = histidin

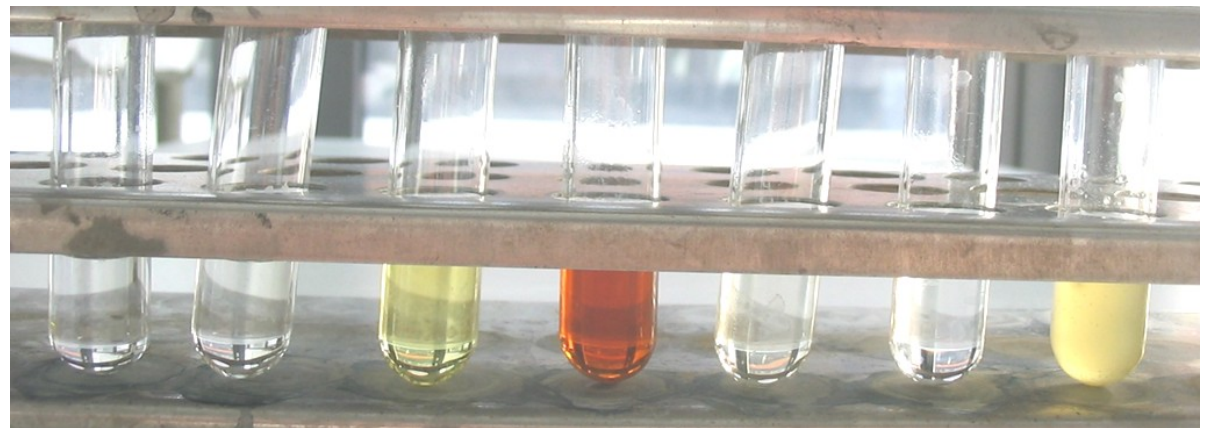
3 = tyrosin

4 = tryptofan

5 = cystein

6 = methionin

7 = BSA



1

2

3

4

5

6

7

úloha č. 2 - kvalitativní stanovení aminokyselin – Paulyho reakce

BSA obsahuje všechny aminokyseliny a proto poskytuje pozitivní reakci, červené zbarvení reakčního produktu histidinu a tyrosinu

1 = arginin

2 = histidin

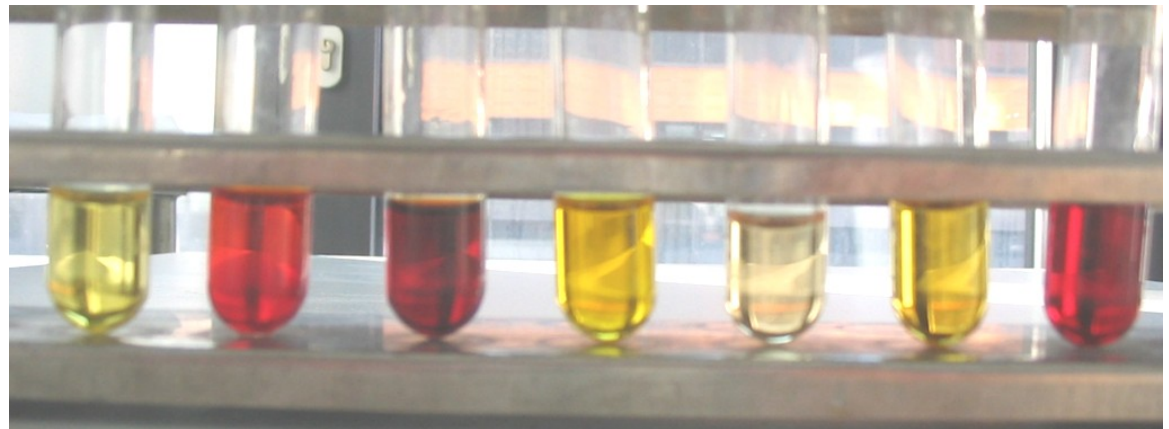
3 = tyrosin

4 = tryptofan

5 = cystein

6 = methionin

7 = BSA



1

2

3

4

5

6

7

úloha č. 2 - kvalitativní stanovení aminokyselin – reakce na síru

BSA obsahuje všechny aminokyseliny a proto poskytuje pozitivní reakci, černé zbarvení reakčního produktu cysteinu

1 = arginin

2 = histidin

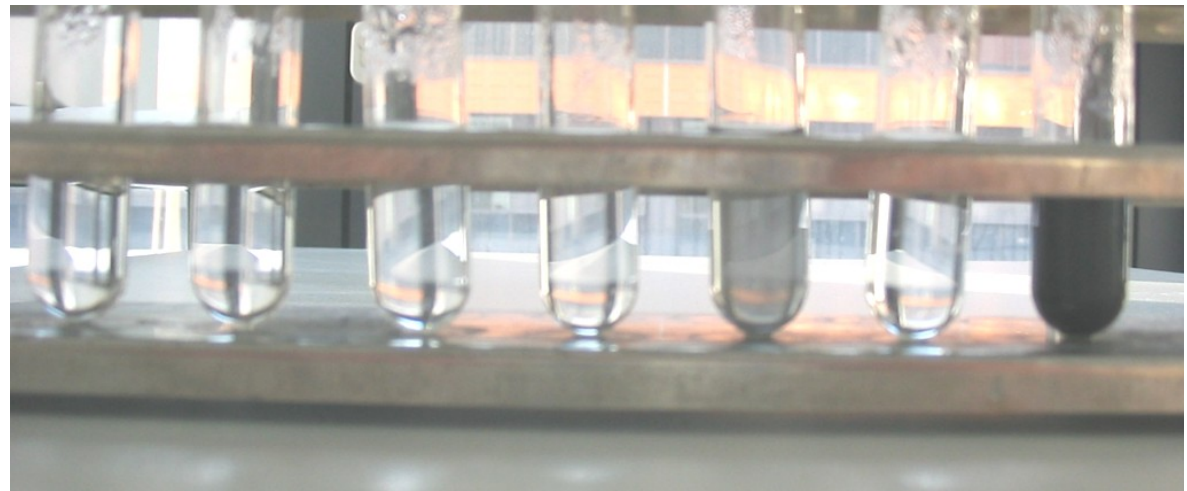
3 = tyrosin

4 = tryptofan

5 = cystein

6 = methionin

7 = BSA



1

2

3

4

5

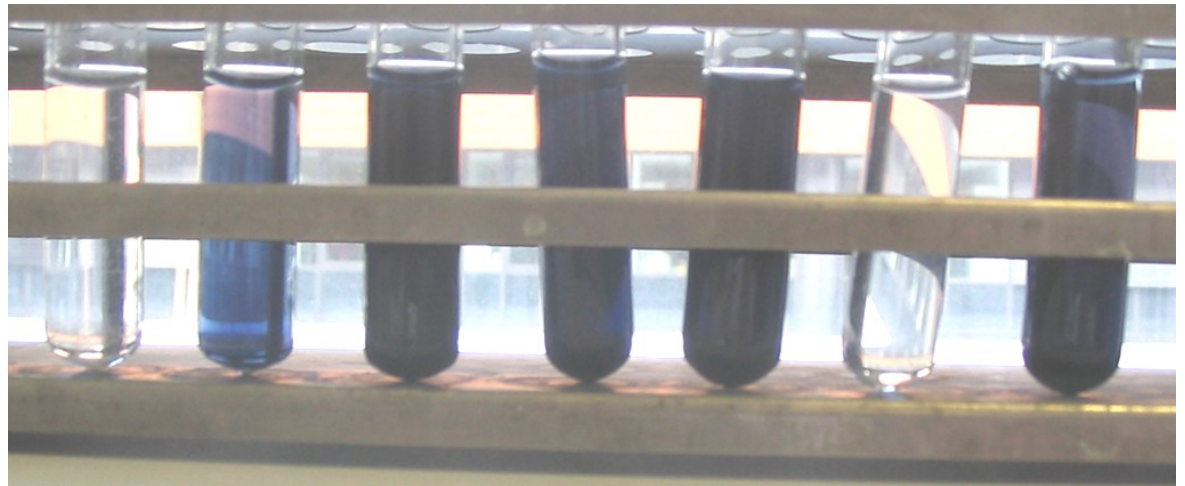
6

7

úloha č. 2 - kvalitativní stanovení aminokyselin – Folinova reakce

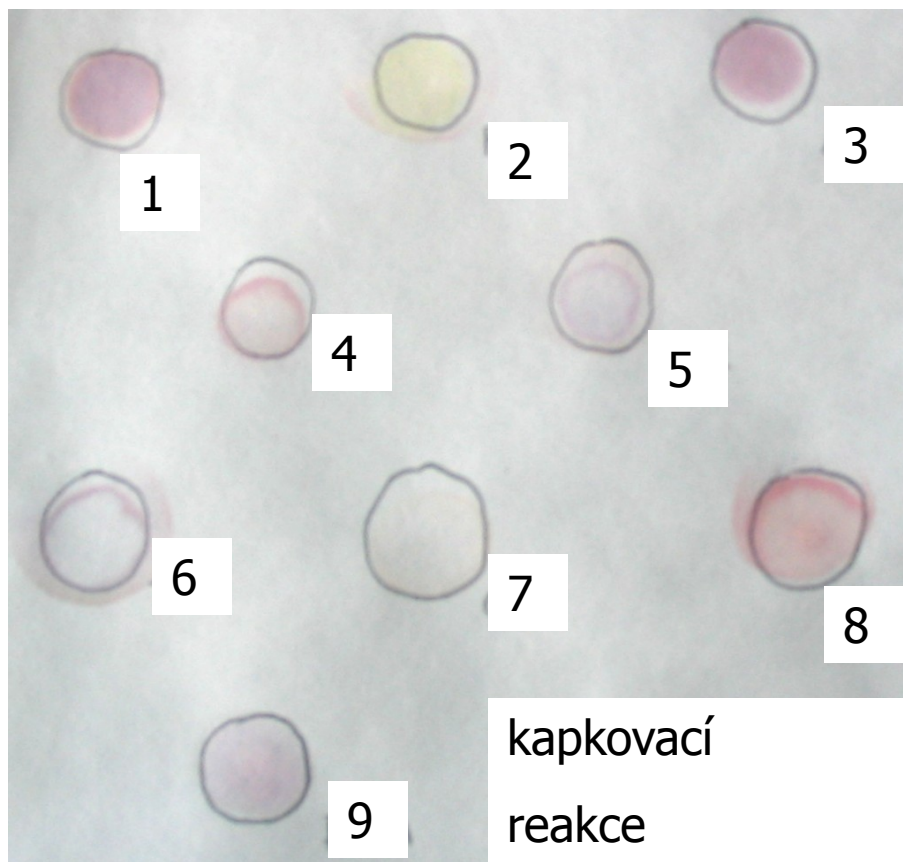
BSA obsahuje všechny aminokyseliny a proto poskytuje pozitivní reakci, modré zbarvení reakčního produktu aminokyselin s redukčními vlastnostmi

- 1 = arginin
- 2 = histidin
- 3 = tyrosin
- 4 = tryptofan
- 5 = cystein
- 6 = methionin
- 7 = BSA



1 2 3 4 5 6 7

úloha č. 2 - kvalitativní stanovení aminokyselin – ninhydrinová reakce



1 = glycin

2 = prolin

3 = arginin

4 = histidin

5 = tyrosin

6 = tryptofan

7 = cystein

8 = methionin

9 = BSA

pozitivní reakci poskytují všechny aminokyseliny, skvrny se liší zbarvením, přítomností okraje apod.

úloha č. 2 - kvalitativní stanovení aminokyselin – biuretová reakce

1 = glycin

2 = prolin

3 = arginin

4 = histidin

5 = tyrosin

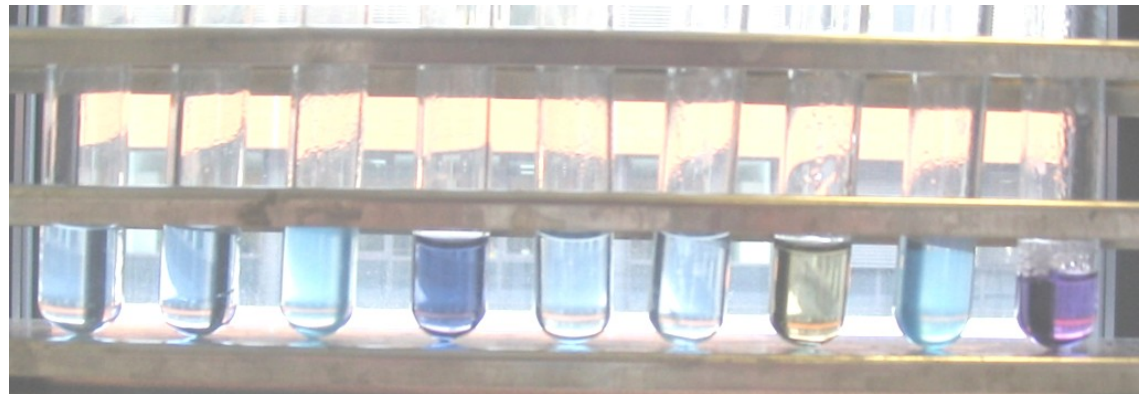
6 = tryptofan

7 = cystein

8 = methionin

9 = BSA

pozitivní reakci (fialové zbarvení) poskytuje pouze BSA obsahující peptidové vazby



1

2

3

4

5

6

7

8

9

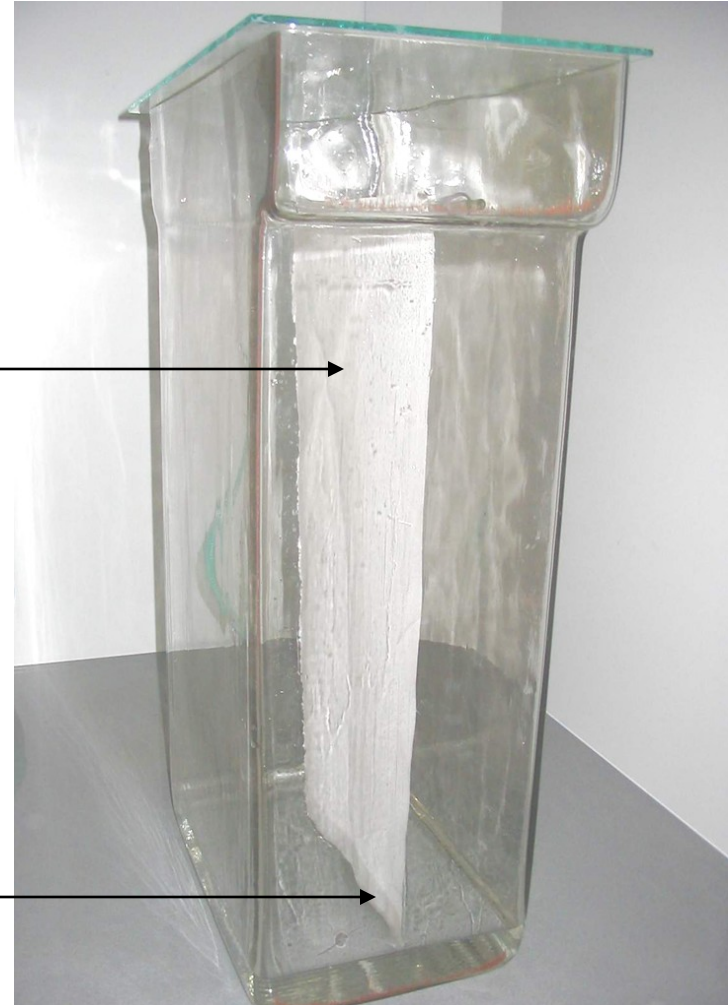
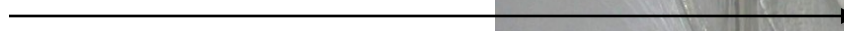
úloha č. 2 - rozdělovací chromatografie aminokyselin

(vyvíjení chromatogramu v chromatografické vaně)

chromatografický papír



mobilní fáze



úloha č. 2 - rozdělovací chromatografie aminokyselin (hotový chromatogram)

- 1 = glycin
- 2 = alanin
- 3 = valin
- 4 = leucin
- 5 = kyselina asparagová
- 6 = kyselina glutamová
- 7 = fenylalanin
- 8 = tyrosin
- 9 = tryptofan
- 10 = histidin
- 11 = lysin
- 12 = arginin



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

úloha č. 2 - rozdělovací chromatografie aminokyselin

interpretace chromatogramu: Aminokyseliny se značně liší svou strukturou, tedy i polaritou.

- glycin vs. alanin vs. leucin vs. valin: s rostoucí délkou řetězce klesá polarita molekuly, roste pohyblivost molekuly v nepolární mobilní fázi
- kys. asparagová vs. kys. glutamová: s rostoucí délkou řetězce klesá polarita molekuly, roste pohyblivost molekuly v nepolární mobilní fázi
- alanin vs. fenylalanin: přítomnost benzenového jádra snižuje polaritu molekuly a zvyšuje pohyblivost molekuly v nepolární mobilní fázi
- glycin vs. kys. asparagová, alanin vs. kys. glutamová: přítomnost karboxylové skupiny v postranním řetězci zvyšuje polaritu molekuly a snižuje její pohyblivost v nepolární mobilní fázi
- fenylalanin vs. tyrosin: přítomnost hydroxylové skupiny na benzenovém jádře zvyšuje polaritu molekuly a snižuje její pohyblivost v nepolární mobilní fázi
- alifatické aminokyseliny vs. lysin, arginin: přítomnost aminoskupiny resp. guanidinové skupiny v postranním řetězci zvyšuje polaritu molekuly a snižuje její pohyblivost v nepolární mobilní fázi
- histidin vs. tryptofan: : přítomnost benzenového jádra snižuje polaritu molekuly a zvyšuje pohyblivost molekuly v nepolární mobilní fázi

úloha č. 2 - kvantitativní stanovení aminokyselin (neutralizační titrace glycinu)

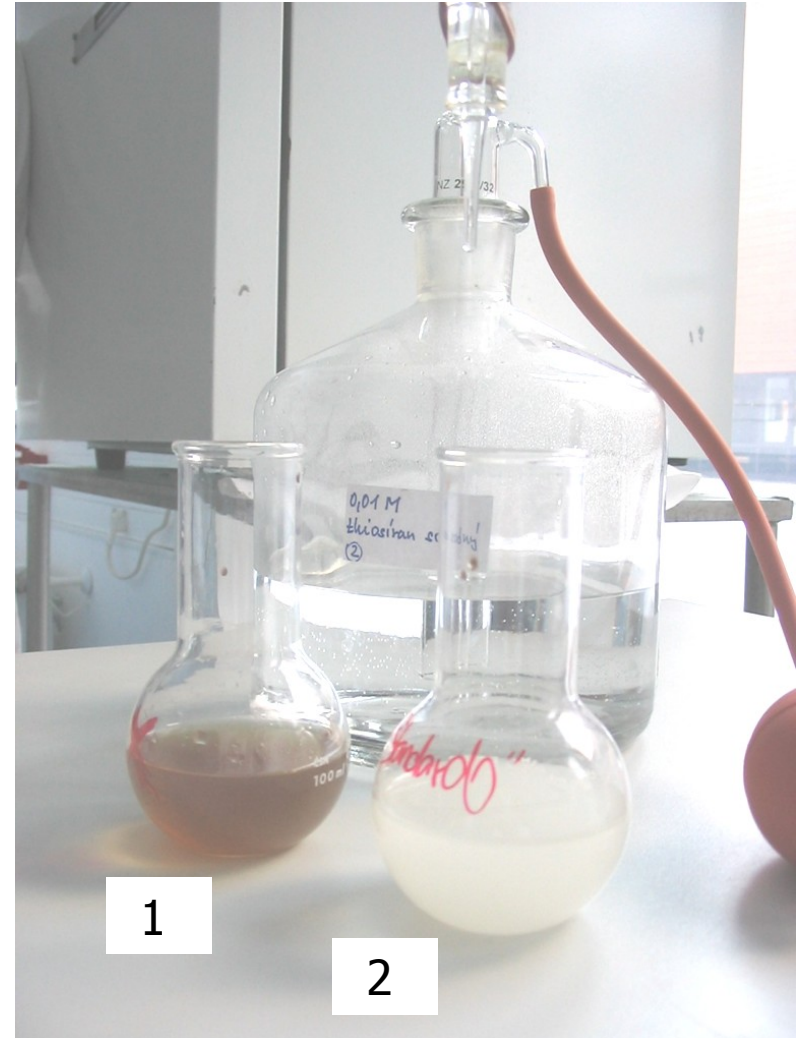
bod ekvivalence
(indikátor: fenolftalein)



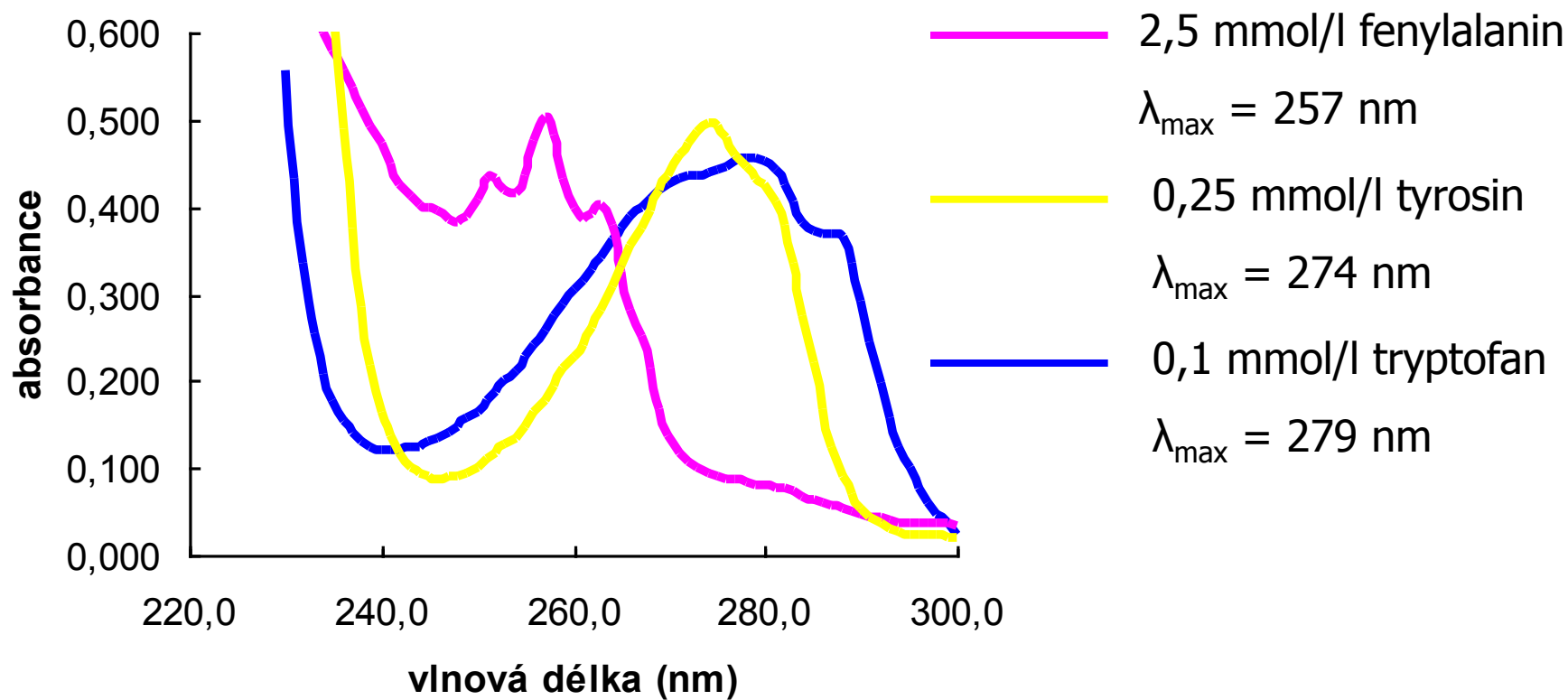
úloha č. 2 - kvantitativní stanovení aminokyseliny (reduktometrická titrace glycinu)

- 1) zbarvení vzorku před titrací
- 2) bod ekvivalence

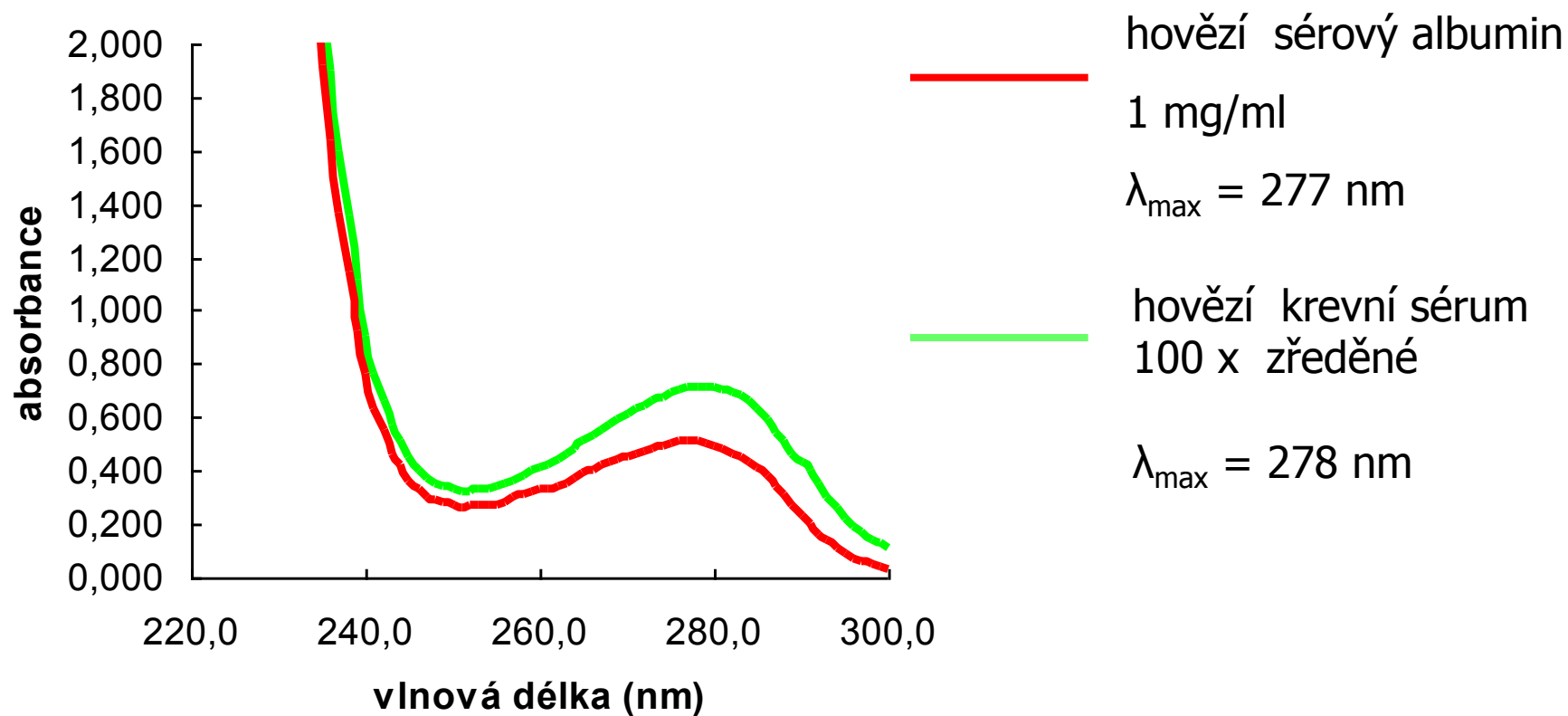
(indikátor: škrob)



úloha č. 3 – UV-absorpční spektra aromatických aminokyselin



úloha č. 3 – UV-absorpční spektra bílkovin



úloha č. 3 - kvantitativní stanovení bílkovin (biuretová reakce)

koncentrace BSA:

1 = 0,0 mg/ml (slepý vzorek)

2 = 0,5 mg/ml

3 = 1,0 mg/ml

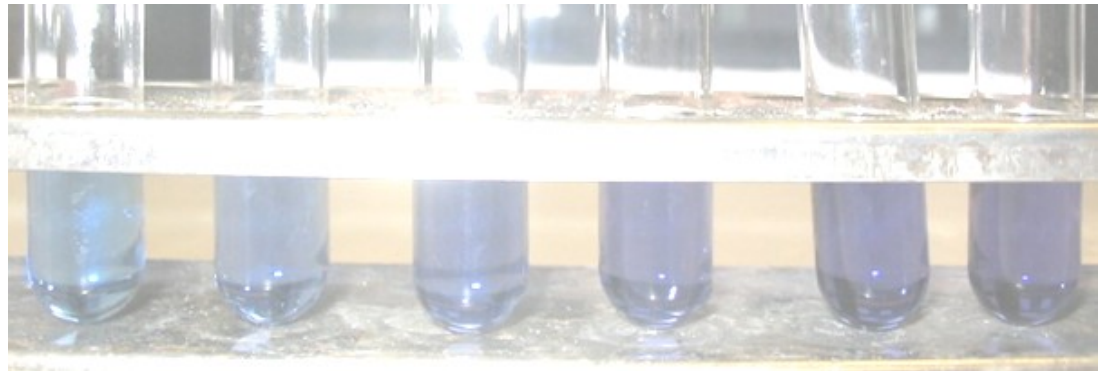
4 = 1,5 mg/ml

5 = 2,0 mg/ml

6 = 2,5 mg/ml

fotometrické stanovení

A_{550}



1

2

3

4

5

6

úloha č. 3 - kvantitativní stanovení bílkovin (Folinova reakce)

koncentrace BSA:

1 = 0,0 mg/ml (slepý vzorek)

2 = 0,05 mg/ml

3 = 0,10 mg/ml

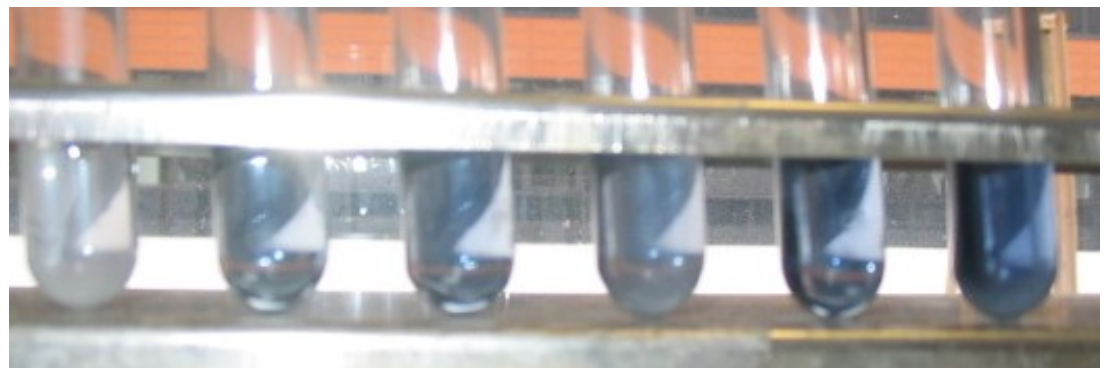
4 = 0,15 mg/ml

5 = 0,20 mg/ml

6 = 0,25 mg/ml

fotometrické stanovení

A_{745}



1

2

3

4

5

6

úloha č. 3 - stanovení koncentrace proteinů podle Kjeldahla (mineralizace proteinů)

odsávací nástavec

vývěva

mineralizační tuby

mineralizační
přístroj



úloha č. 3 - stanovení koncentrace proteinů podle Kjeldahla (uvolnění amoniaku z mineralizovaného vzorku hydroxidem sodným)

poloautomatický Kjeldahlův přístroj

dávkovací pumpa pro hydroxid sodný

tuba obsahující mineralizovaný protein

předloha obsahující kyselinu boritou a indikátor

zásobník hydroxidu sodného



úloha č. 3 - stanovení koncentrace proteinů podle Kjeldahla (vydestilování amoniaku do předlohy)

poloautomatický Kjeldahlův přístroj

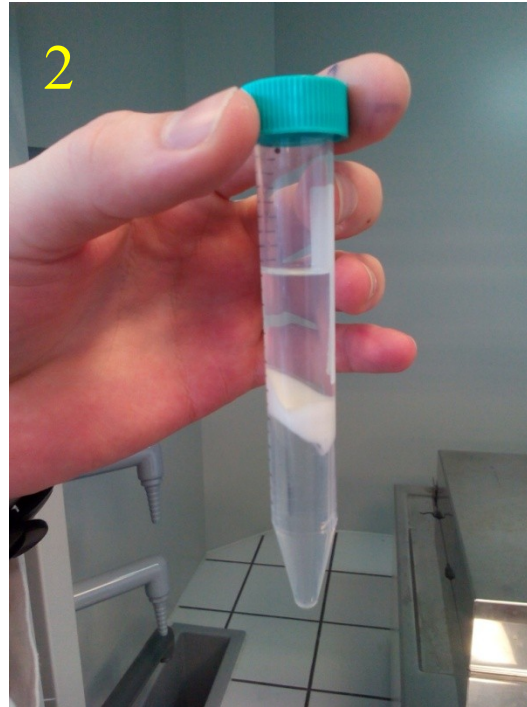
parní ventil

tuba obsahující mineralizovaný protein

předloha obsahující kyselinu boritou a indikátor



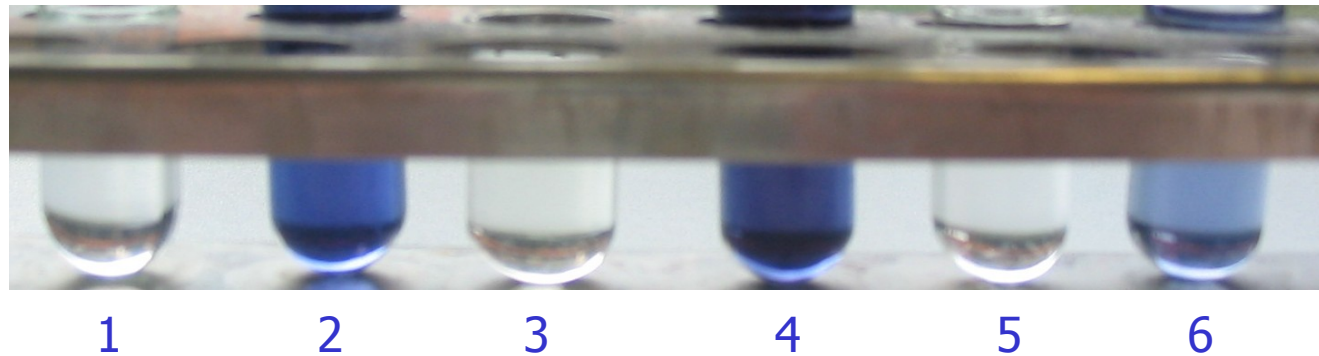
úloha č. 4 – izolace nukleoproteinů z bakteriálních buněk



- 1 - lýze buněk
- 2 - deproteinace
- 3 - precipitace nukleoproteinů

úloha č. 4 - identifikace DNA obsažené v nukleoproteinu pomocí barevné reakce (s difenylaminovým činidlem)

- 1 = fyziologický roztok
- 2 = 2'-deoxyribosa
- 3 = ribosa
- 4 = DNA
- 5 = RNA
- 6 = nukleoprotein

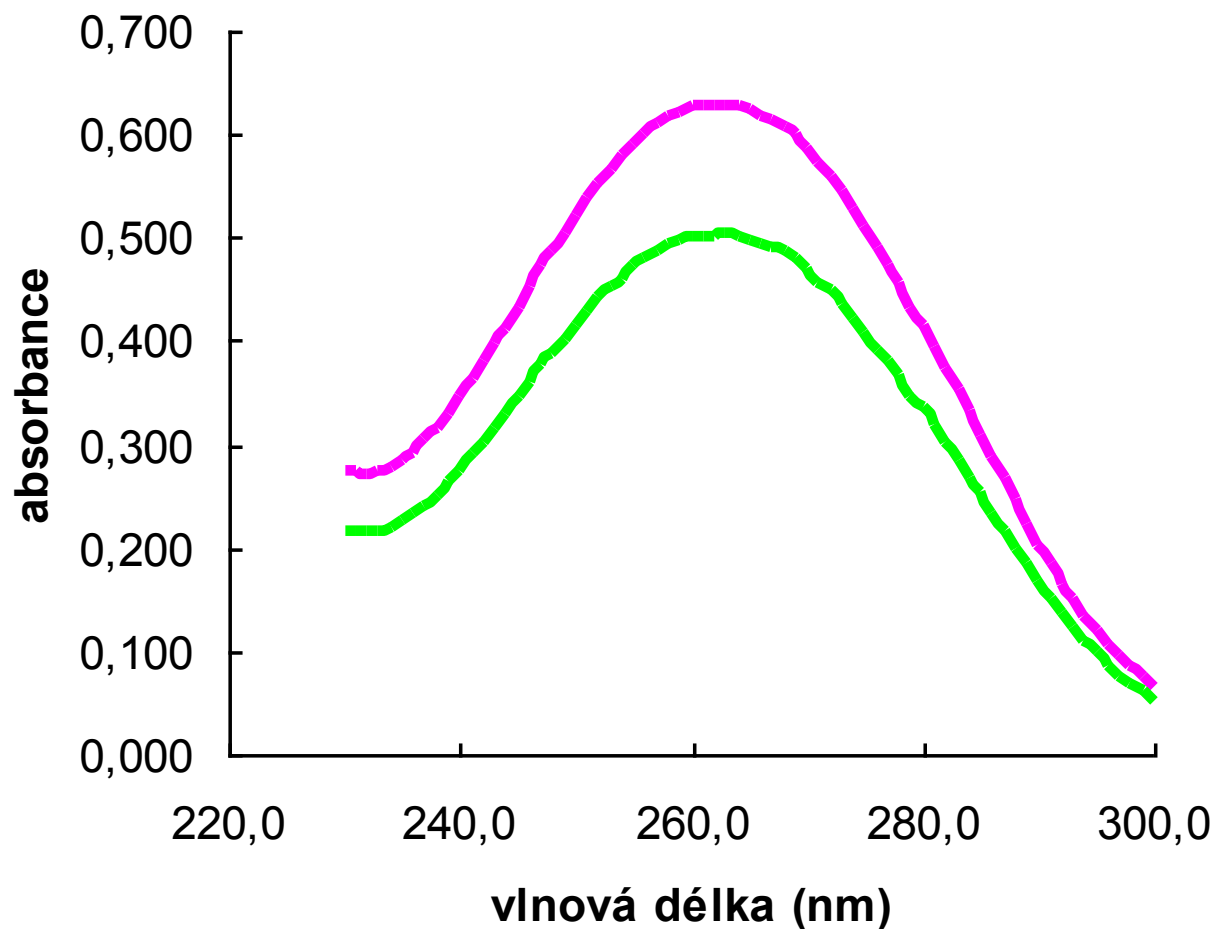


úloha č. 4 - UV – absorpční spektrum DNA (0,025 mg/ml)

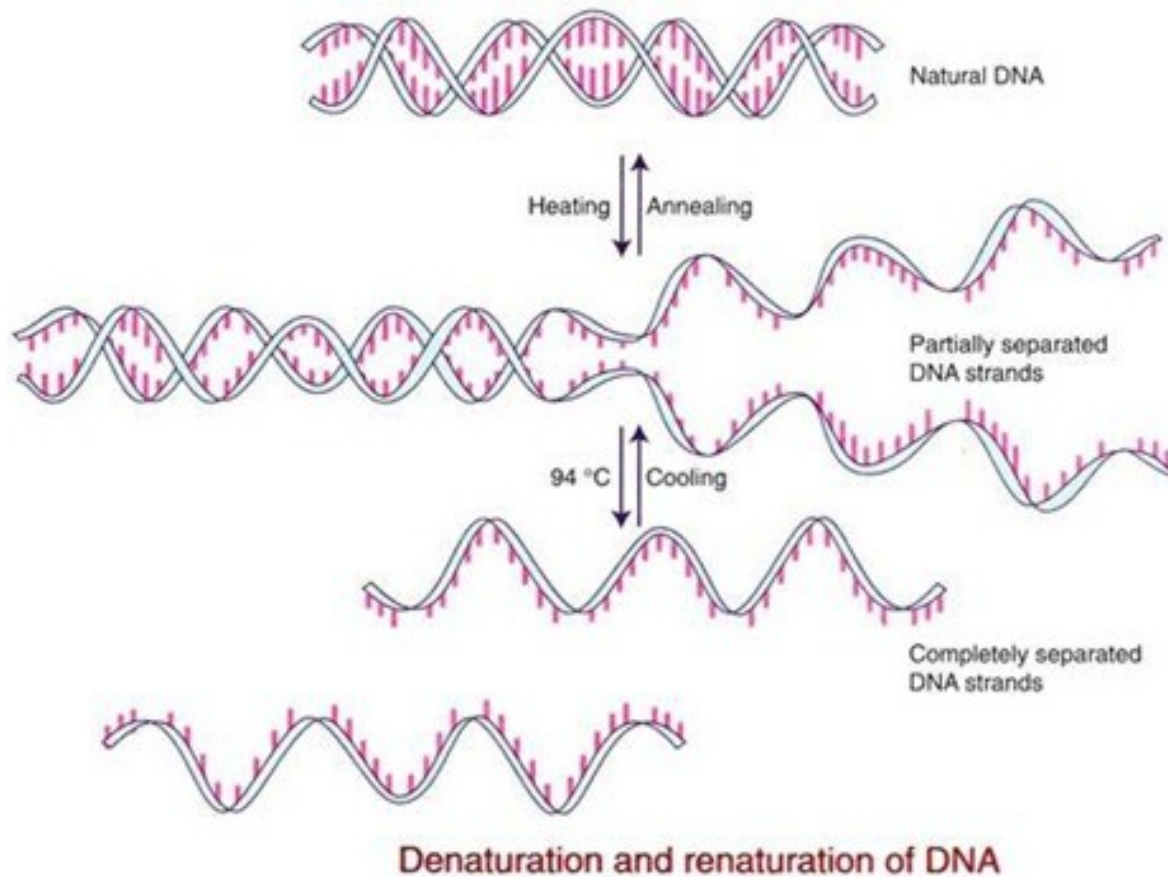
$\lambda_{\max} = 263 \text{ nm}$

ds-DNA
(nativní)

ss-DNA
(denaturovaná)



úloha č. 4 – denaturace DNA



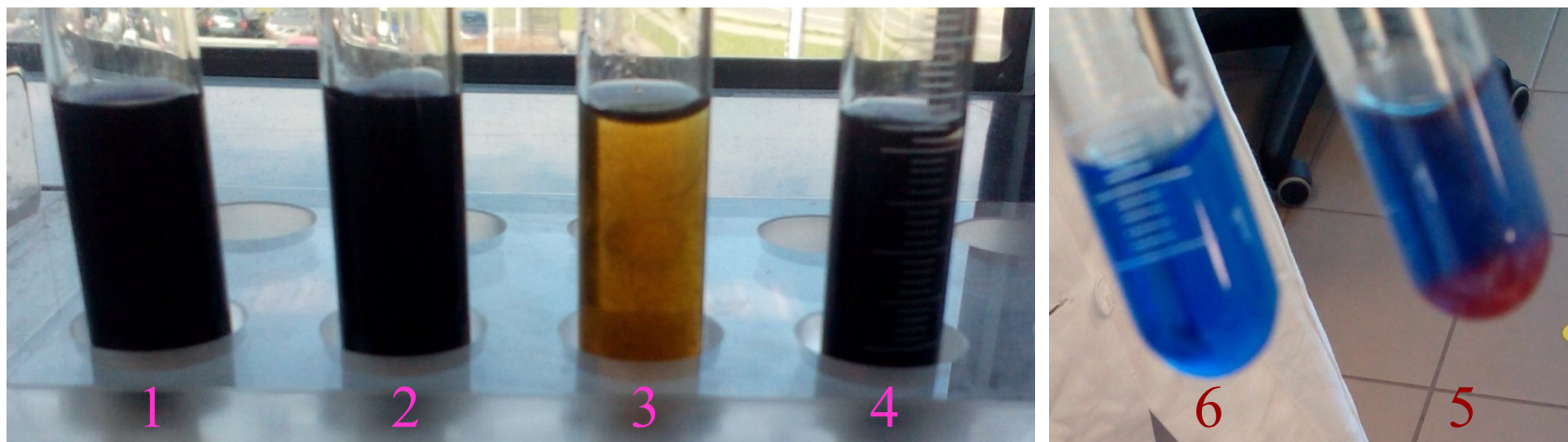
úloha č. 5 – enzymové reakce



stanovení enzymové aktivity:

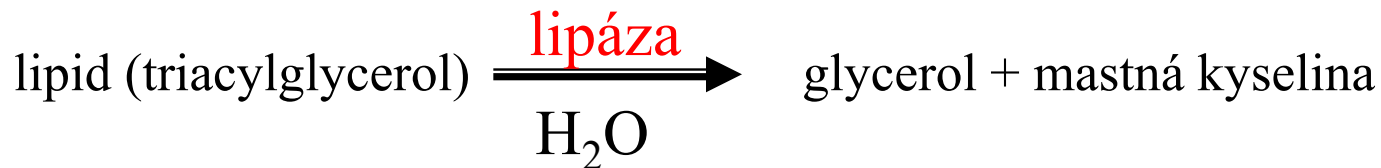
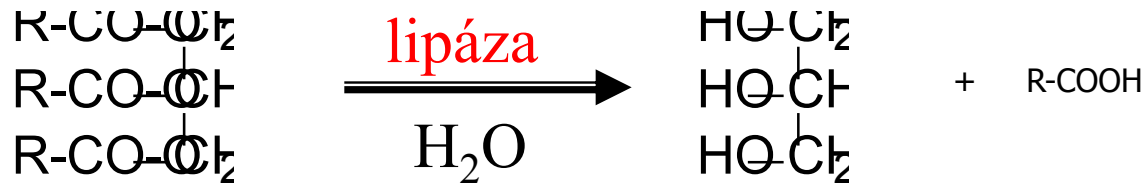
- 1) rychlost úbytku substrátu
- 2) rychlost přírůstku produktu

úloha č. 5 – amylázová reakce



| čas (min.) | 0 | 60 | 60 |
|------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| | zbarvení vzorku po přidání Lugolova roztoku | zbarvení vzorku po přidání Lugolova roztoku | zbarvení vzorku po Fehlingově reakci |
| zkumavka A | 1 | 3 | 5 |
| zkumavka B | 2 | 4 | 6 |

úloha č. 5 – lipázová reakce

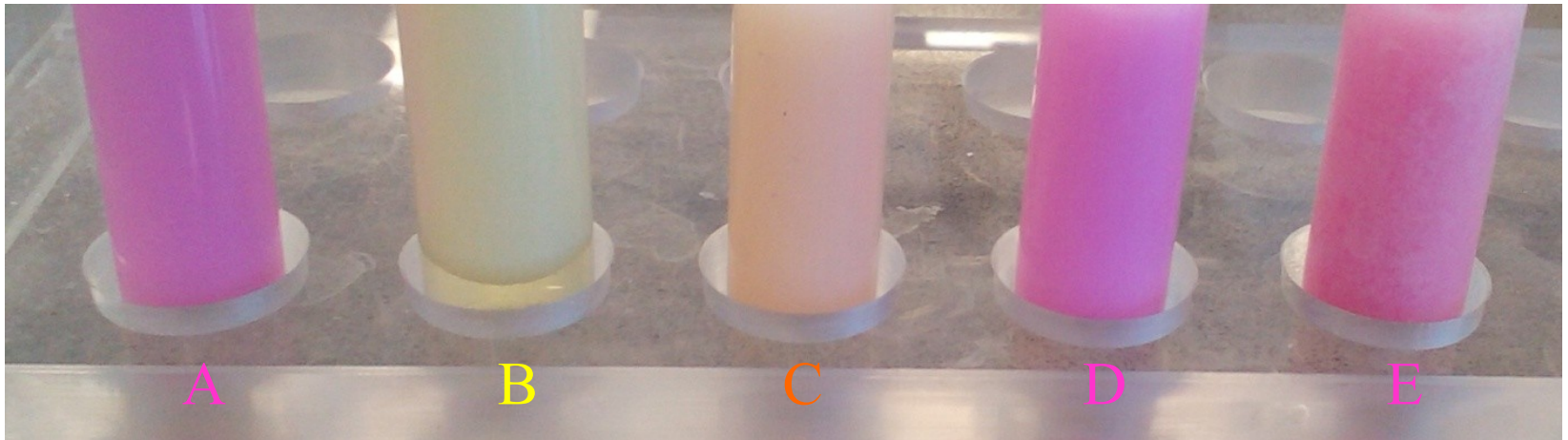


stanovení aktivity lipázy:

přírůstek produktu – detekce vzniku mastných kyselin

pomocí změny zbarvení acidobazického indikátoru

úloha č. 5 – lipázová reakce



A - neutralizované mléko

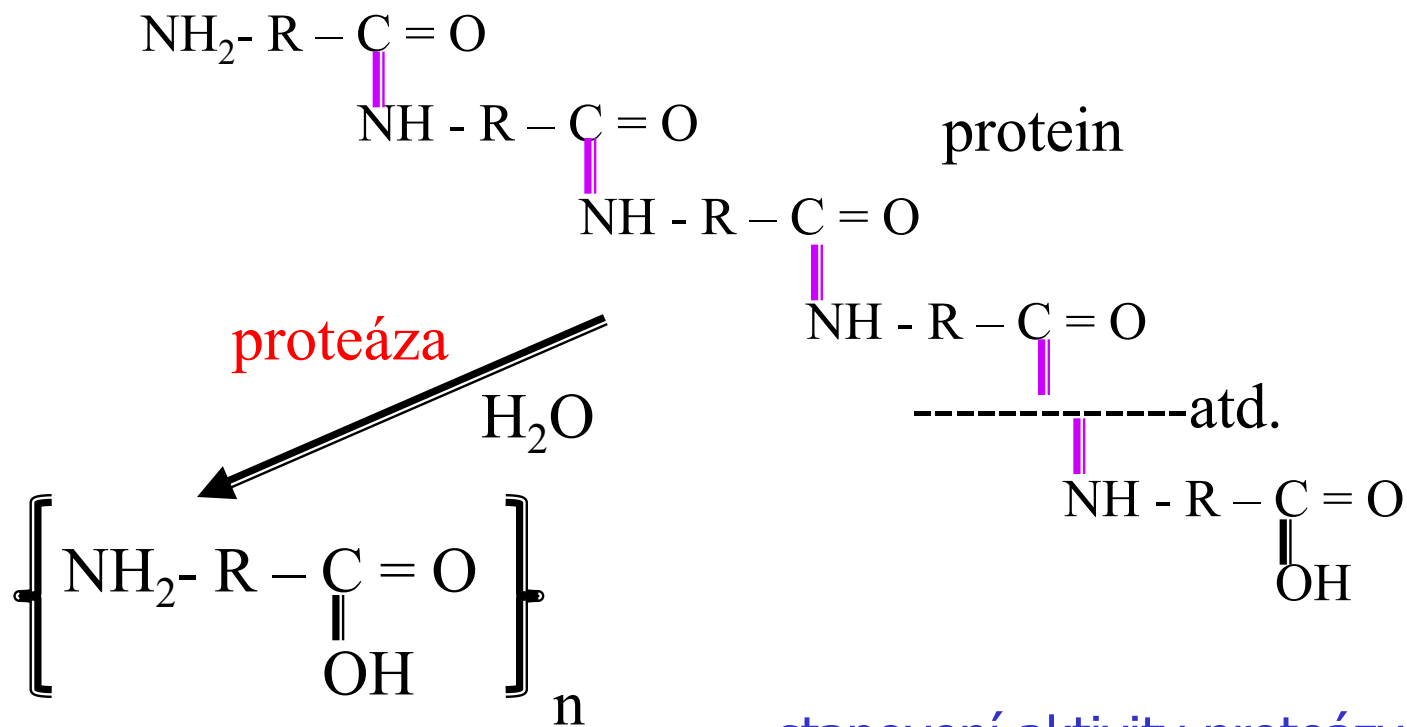
B - okyselené mléko

C – neutralizované mléko po působení lipázy, teplota 37 °C

D – neutralizované mléko po působení lipázy, teplota 0 °C

E – neutralizované mléko po působení lipázy, teplota 80 °C

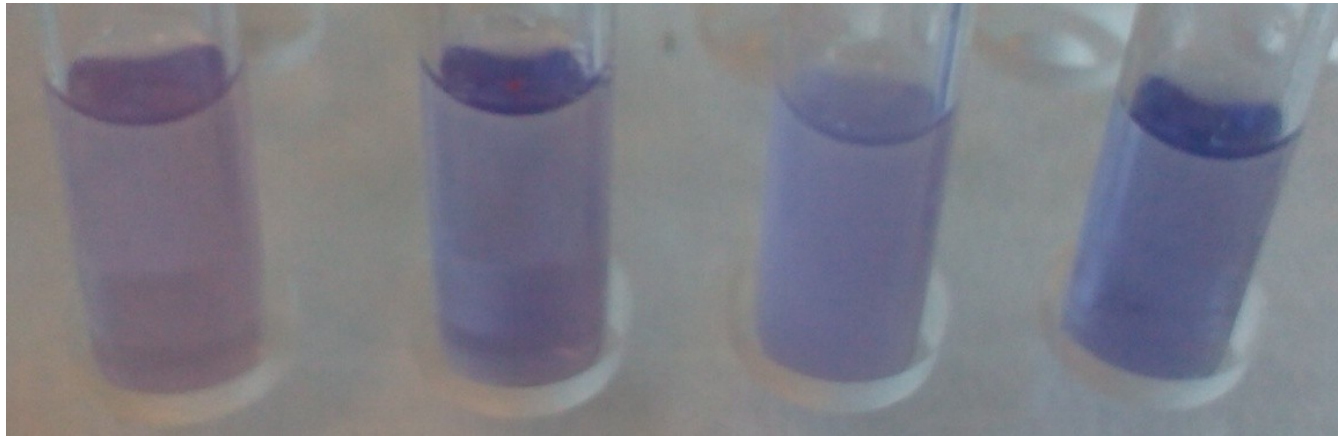
úloha č. 5 – proteázová reakce



volné aminokyseliny

stanovení aktivity proteázy:
úbytek substrátu – stanovení
koncentrace proteinu pomocí biuretové
reakce

úloha č. 5 – proteázová reakce



A'

B'

C'

D'

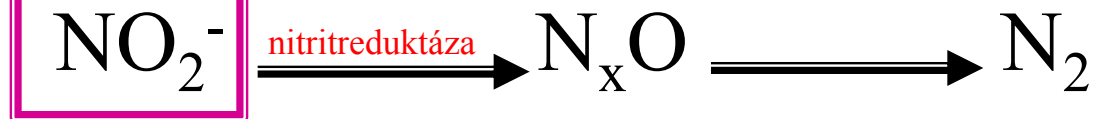
- A - biuretová reakce po působení proteázy v neutrálním prostředí
- B - biuretová reakce po působení proteázy v kyselém prostředí
- C - biuretová reakce po působení proteázy v alkalickém prostředí
- D - biuretová reakce bez působení proteázy

úloha č. 5 – nitritreduktázová a nitrátreduktázová reakce

C,D

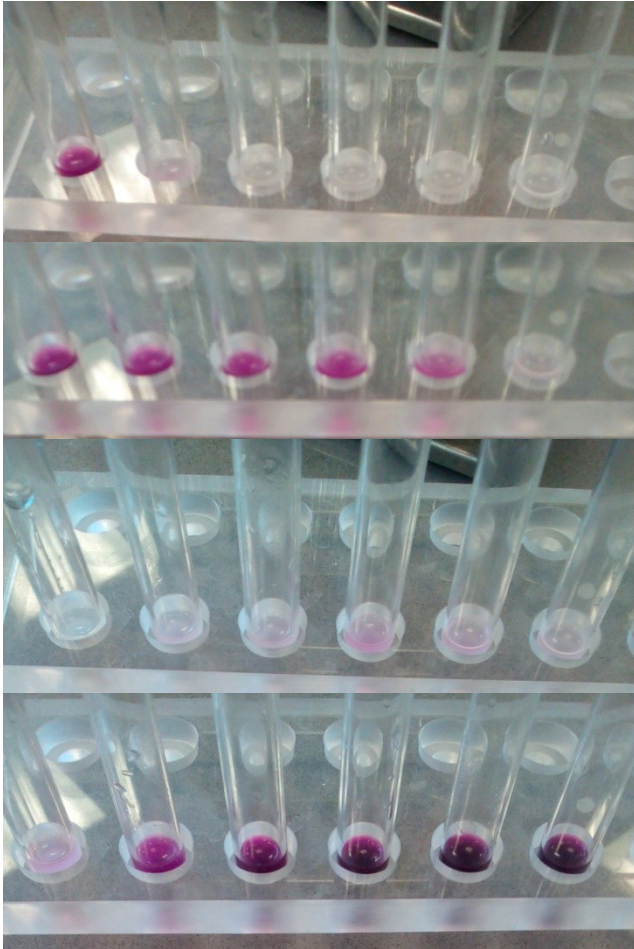


A,B



- stanovení aktivity nitrátreduktázy: přírůstek meziprojektu – detekce dusitanu pomocí kopulační reakce
- stanovení aktivity nitritreduktázy: úbytek substrátu – detekce dusitanu pomocí kopulační reakce

úloha č. 5 – nitrátreduktázová a nitritreduktázová reakce



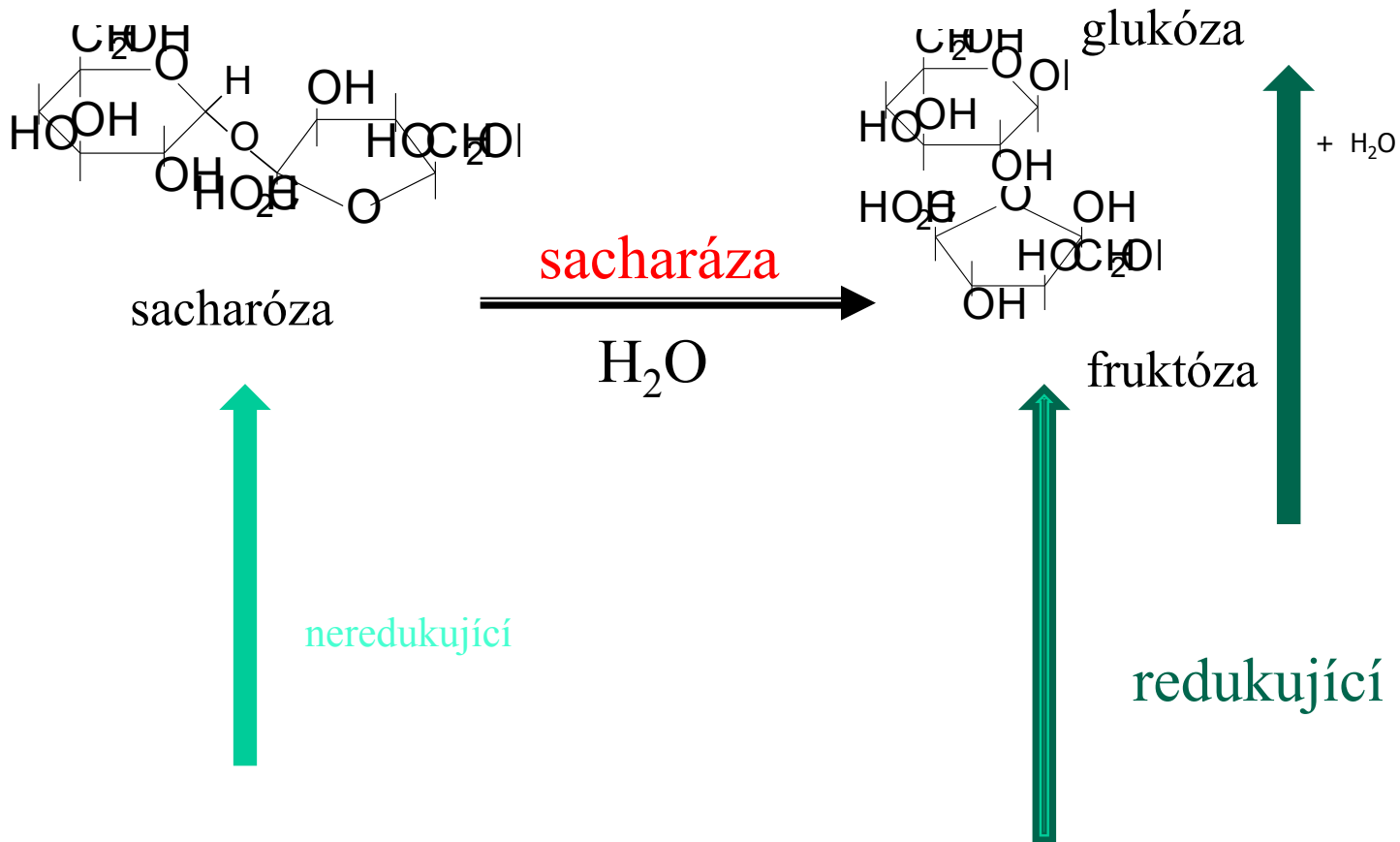
A – redukce dusitanu

B – redukce dusitanu
v přítomnosti antimycinu A

C – redukce dusičnanu

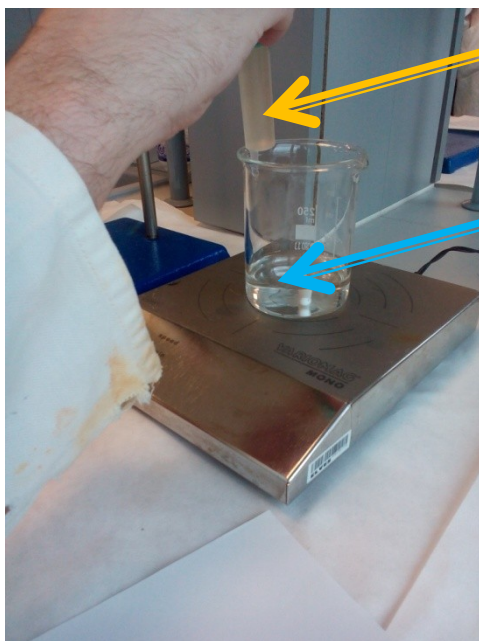
D – redukce dusičnanu
v přítomnosti antimycinu A

úloha č. 6 – sacharóza z kvasnic



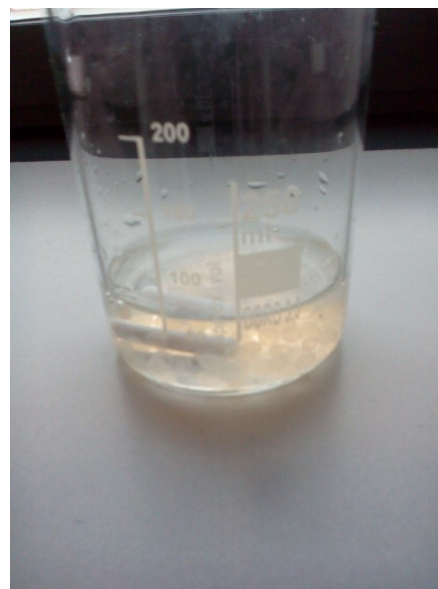
stanovení aktivity sacharózy: přírůstek
produktu – redukujících monosacharidů

úloha č. 6 – enzymový minireaktor (příprava enzymového minireaktoru)

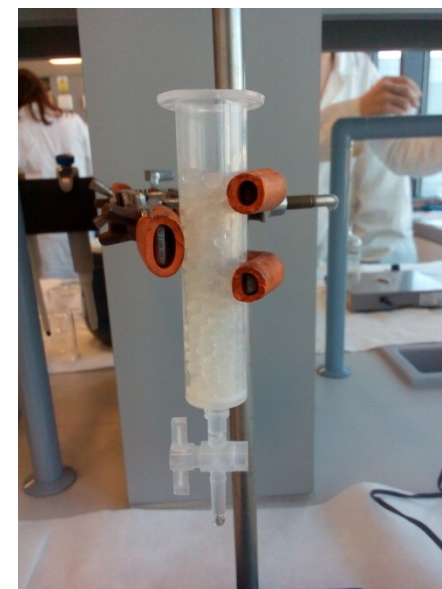


kvasničný extrakt v alginátu sodném

míchaný roztok chloridu vápenatého



částice alginátového
gelu v kádince



kolonka naplněná
alginátovým gelem

úloha č. 6 – enzymový minireaktor

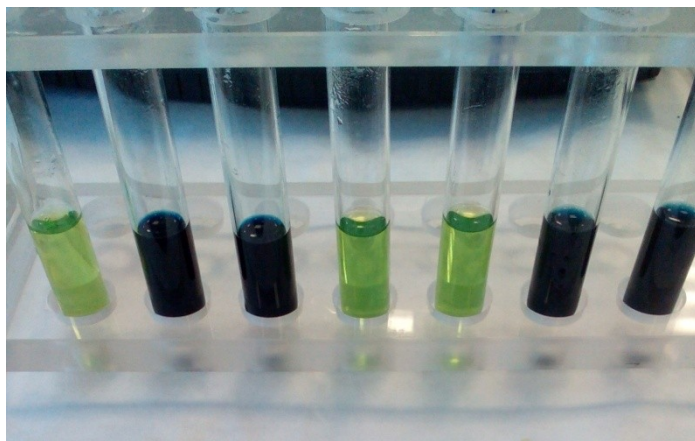
(odběr frakcí z enzymového minireaktoru – detekce redukujících monosacharidů Somogyi-Nelsonovou metodou)



odběr frakcí po
0 (kontrolní vzorek), 1, 2, 5, 10, 15, 20 minutách

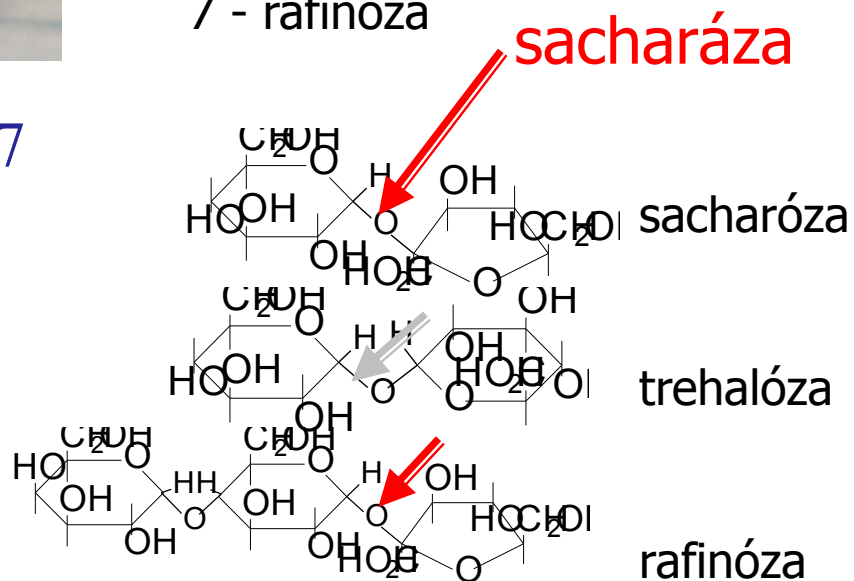
úloha č. 6 – substrátová specifita sacharázy

(detekce redukujících monosacharidů Somogyi-Nelsonovou metodou)



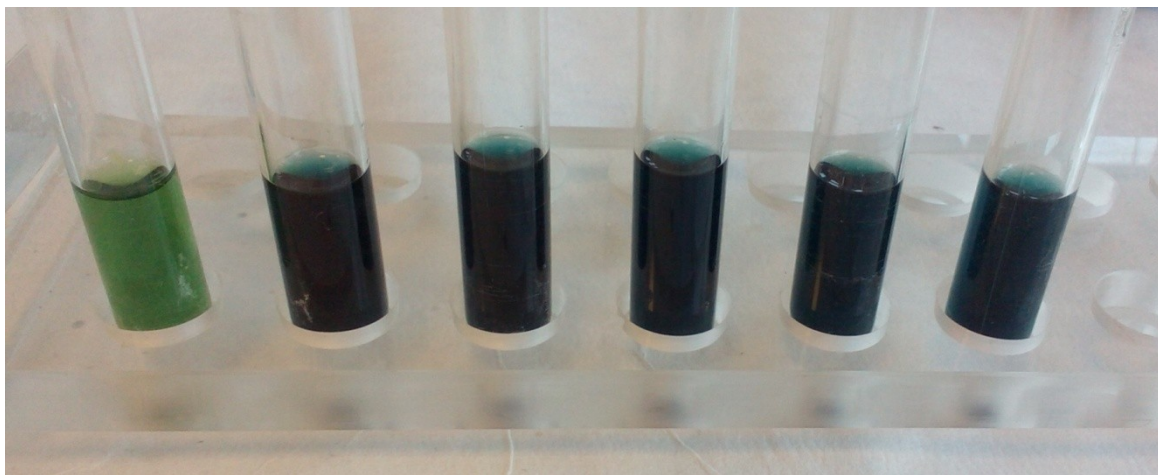
- 1 - kontrolní vzorek
- 2 - sacharóza
- 3 - sacharóza
- 4 - trehalóza
- 5 - trehalóza
- 6 - rafinóza
- 7 - rafinóza

1 2 3 4 5 6 7



úloha č. 6 – stanovení aktivity sacharázy v kvasnicích

(detekce redukujících monosacharidů Somogyi-Nelsonovou metodou)

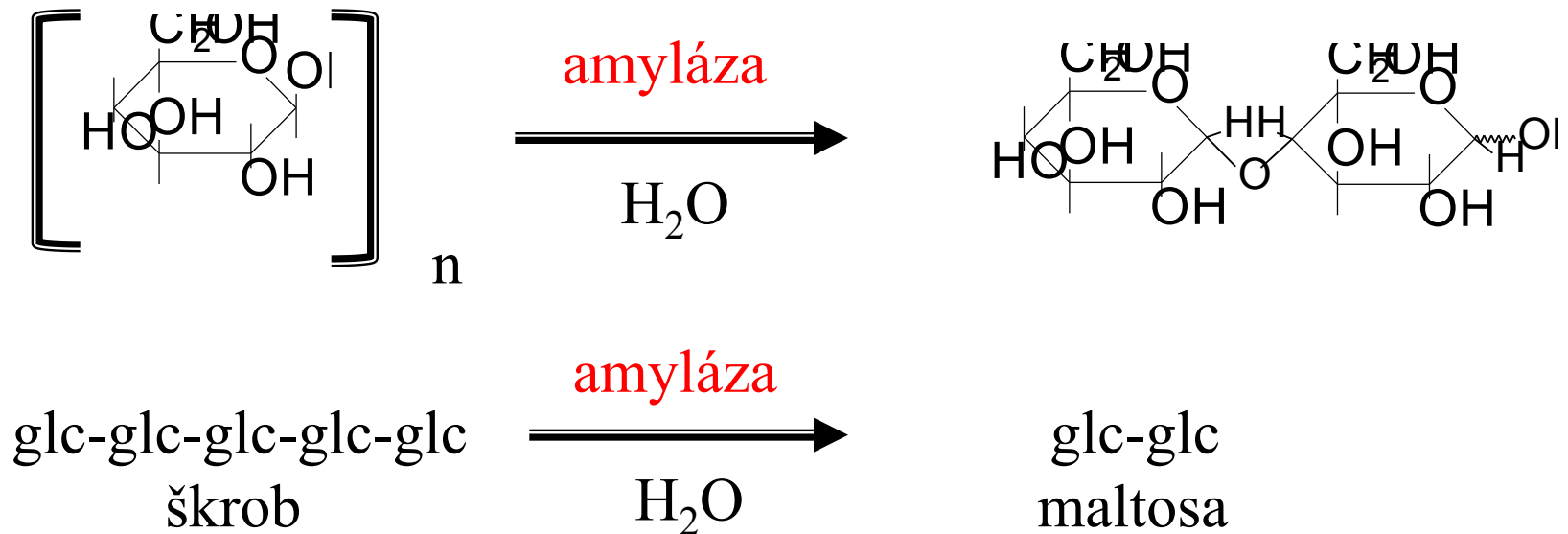


1 – kontrolní vzorek

2-6 – paralelní stanovení aktivity sacharázy

$$v = \Delta n / \Delta t$$

úloha č. 7 – amylázová reakce

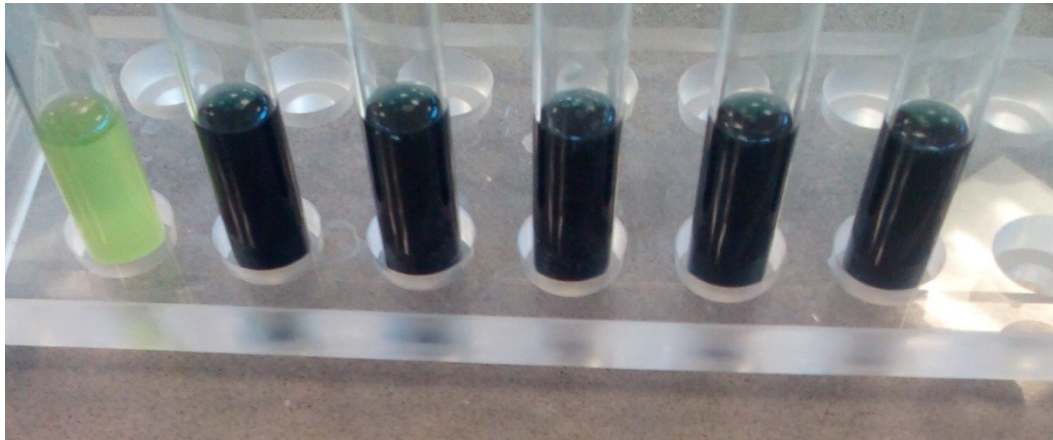


stanovení aktivity amylázy:

- 1) úbytek substrátu – Lugolova reakce, detekce úbytku škrobu
- 2) přírůstek produktu – Somogyi-Nelsonova reakce, detekce vzniku maltózy (redukující sacharid)

úloha č. 7 – stanovení aktivity slinné amylázy ve slinách

(detekce redukujících monosacharidů Somogyi-Nelsonovou metodou)



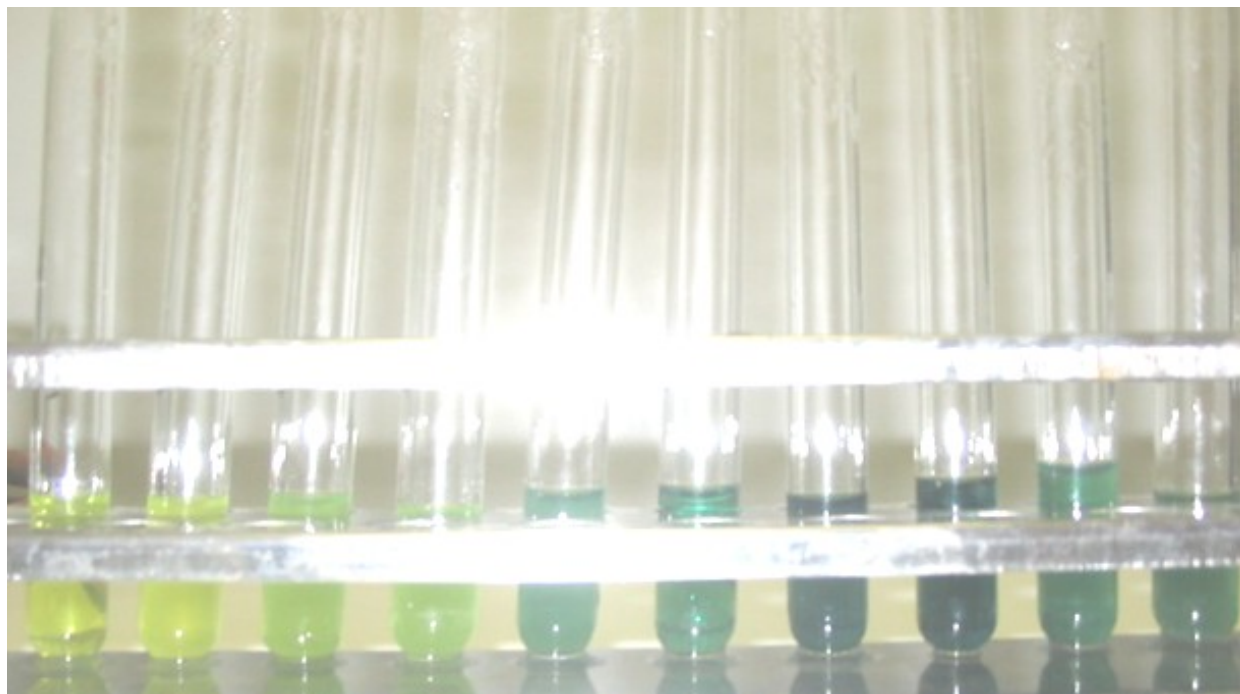
1 – kontrolní vzorek

2-6 – paralelní stanovení aktivity amylázy

$$v = \Delta n / \Delta t$$

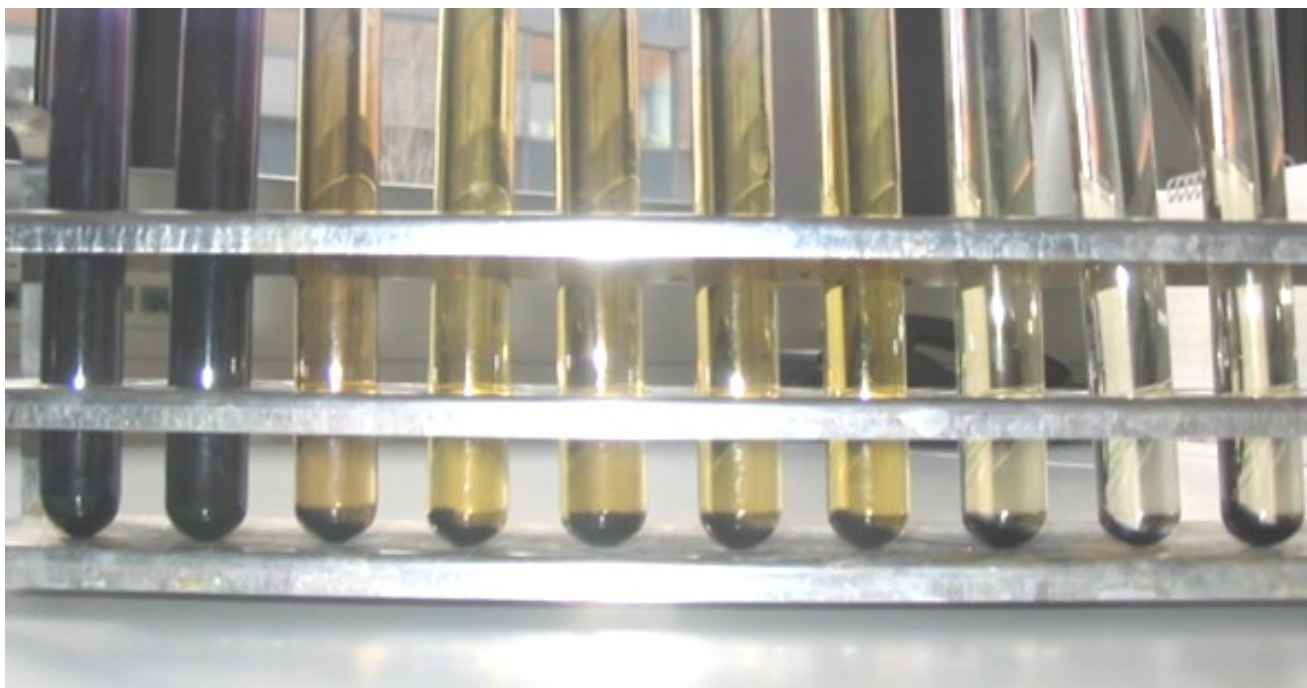
úloha č. 7 - pH optimum slinné amylasy

(detekce redukujících monosacharidů Somogyi-Nelsonovou metodou)



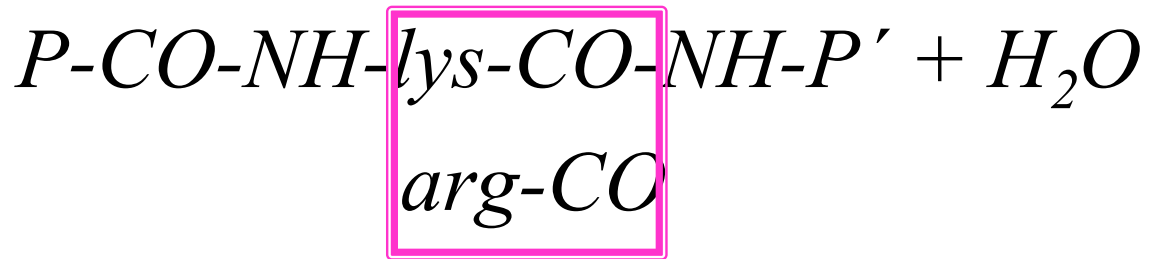
pH **3** **4** **5,5** **6** **6,5** **7** **7,5** **8** **8,5** **9**

úloha č. 7 - pH optimum slinné amylasy (detekce škrobu Lugolovým roztokem)



pH 3 4 5,5 6 6,5 7 7,5 8 8,5 9

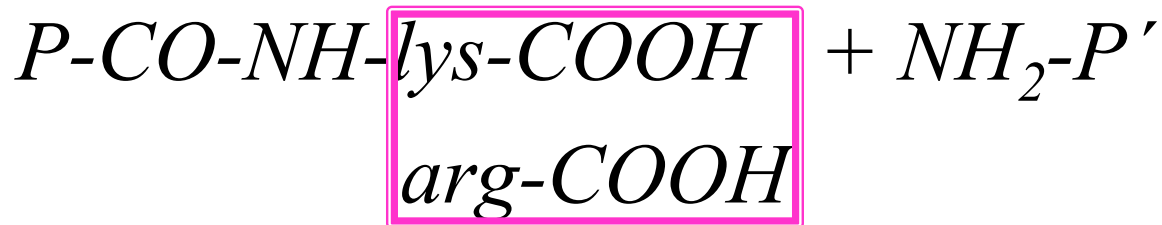
úloha č. 8 – stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce



koncentrace trypsinu = ?

trypsin

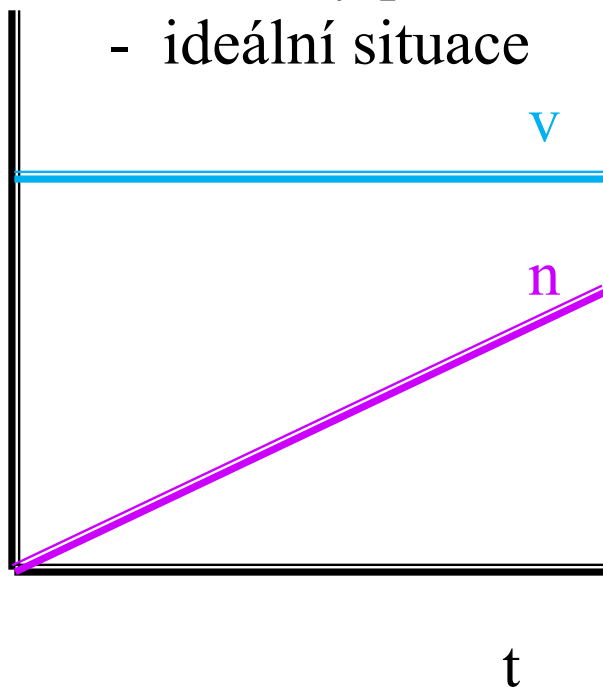
→



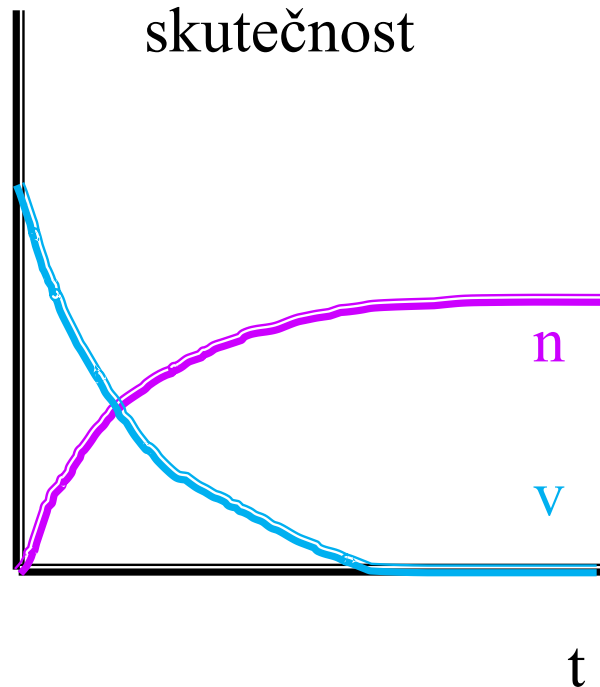
titrace

úloha č. 8 – stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce

teoretický průběh
- ideální situace



skutečnost



rychlost enzymové reakce: $\text{mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$, mol.s^{-1}

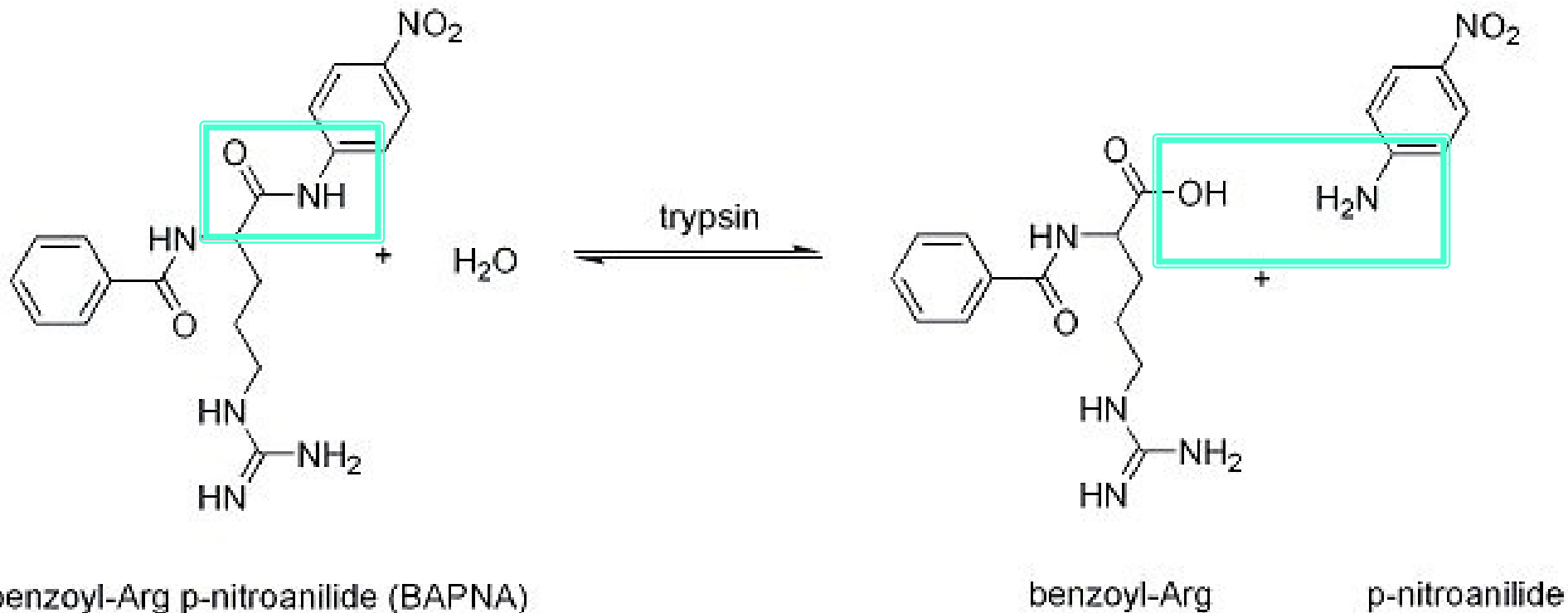
aktivita: mol.s^{-1}

specifická aktivita: $\text{mol.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, $\text{mol.s}^{-1}.\text{ml}^{-1}$

molekulární aktivita (číslo přeměny):

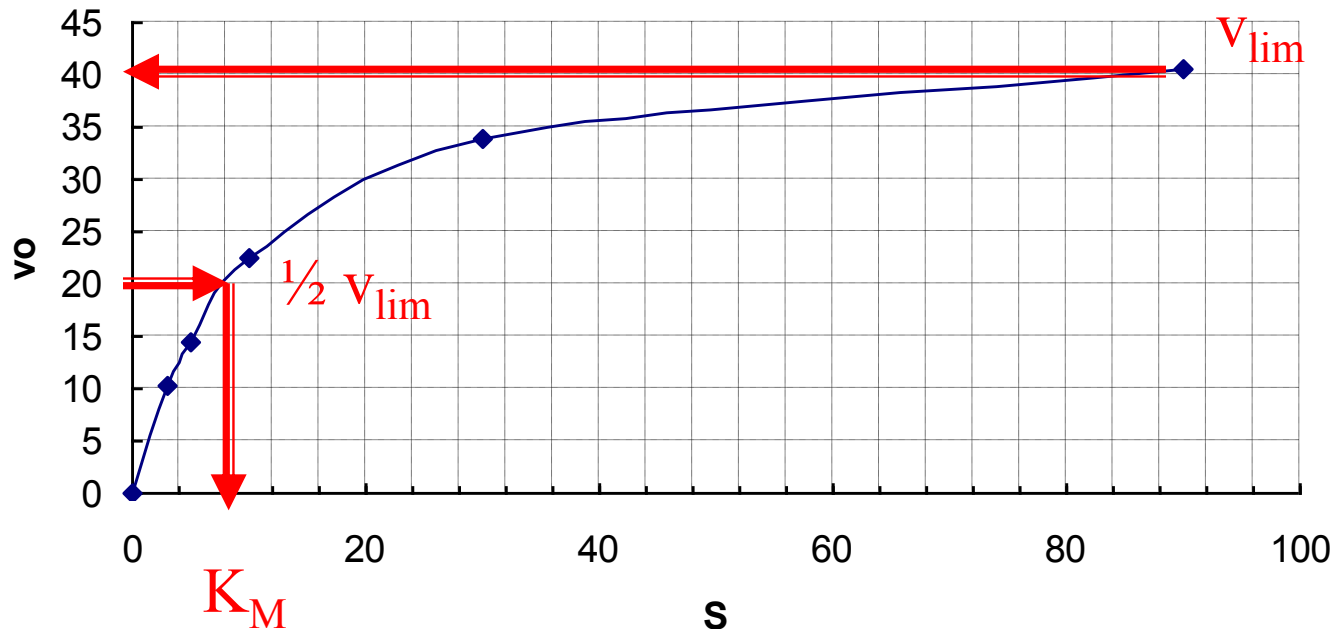
$$\text{mol.s}^{-1}.\text{mol}^{-1} = \text{s}^{-1}$$

úloha č. 9 – stanovení Michaelisovy konstanty trypsinové reakce

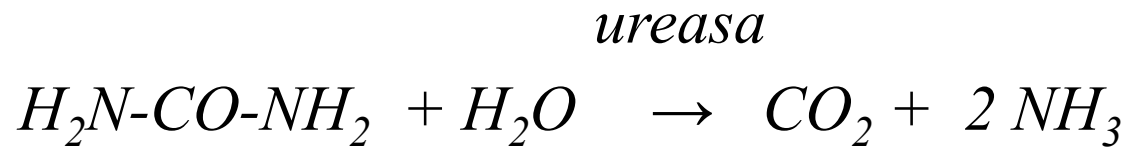


úloha č. 9 – stanovení Michaelisovy konstanty trypsinové reakce

Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu



úloha č. 10 – ureázová reakce



fotometrické
stanovení

standard – 20 mmol/l močovina..... A_1

neznámý vzorek močoviny - x mmol/l..... A_2

$$x : 20 = A_2 : A_1$$

úloha č. 10 - stanovení koncentrace močoviny

(kalibrační přímka pro stanovení koncentrace amonných
iontů Nesslerovým činidlem)

koncentrace amonných iontů:

1 = 0,00 mmol/l (slepý vzorek)

2 = 0,04 mmol/l

3 = 0,08 mmol/l

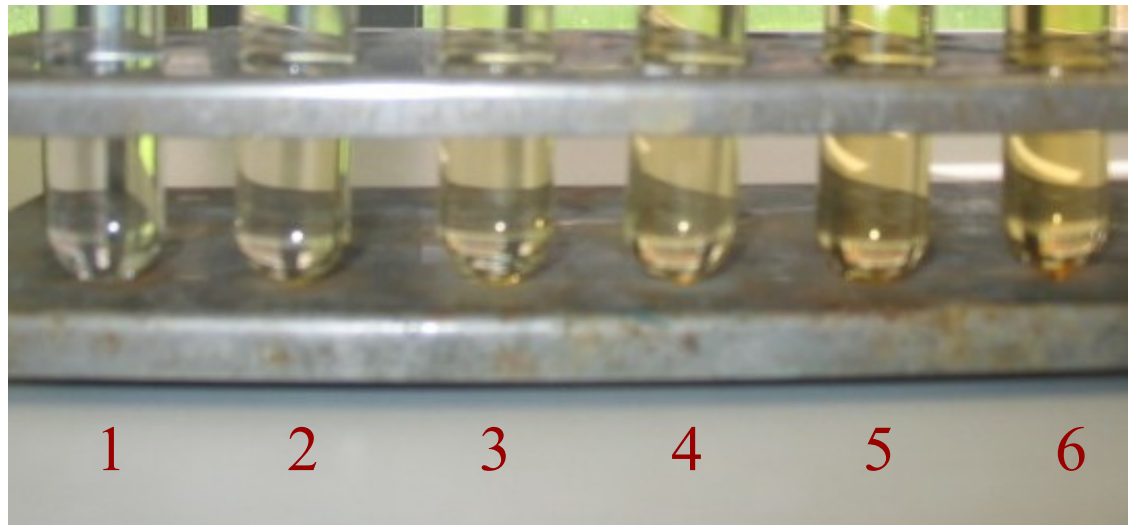
4 = 0,12 mmol/l

5 = 0,16 mmol/l

6 = 0,20 mmol/l

fotometrické stanovení

A_{436}



úloha č. 10 – alkoholdehydrogenázová reakce

alkoholdehydrogenáza



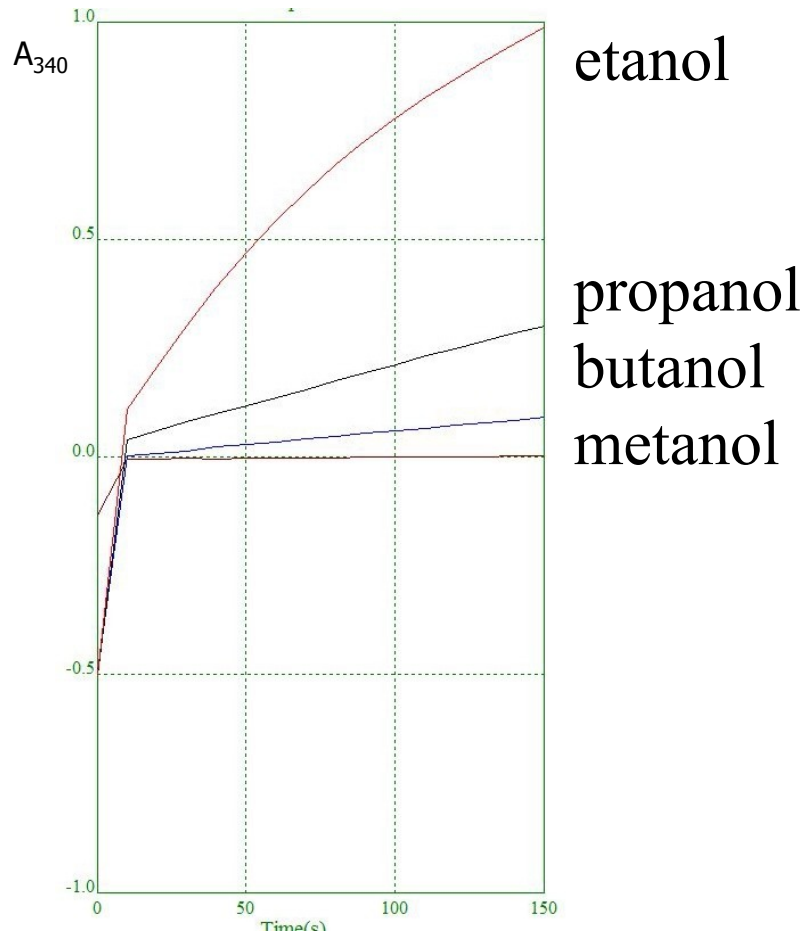
Warburgův test

A_{340}

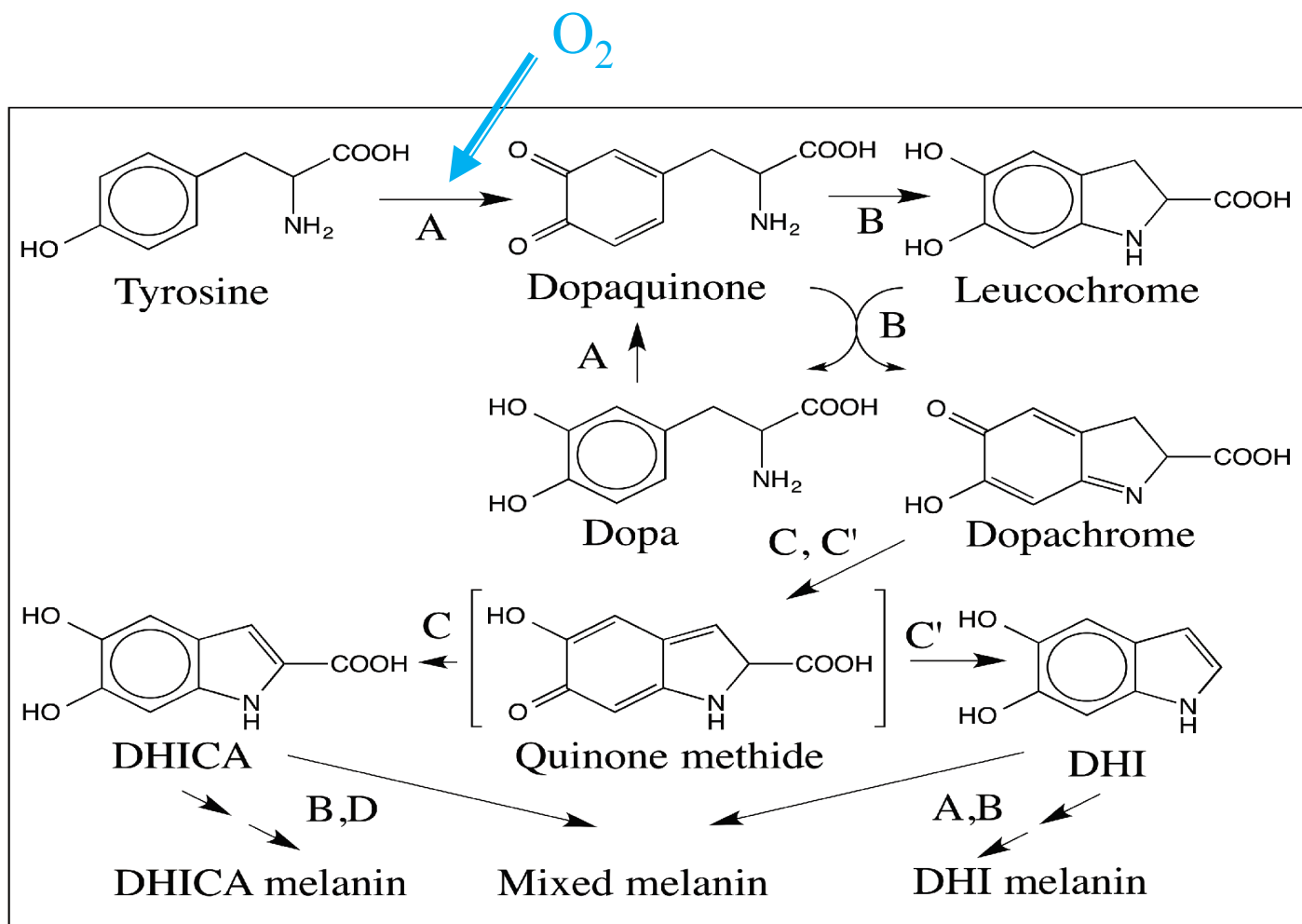


úloha č. 10 – substrátová specifita alkoholdehydrogenázy

(kinetické měření, Warburgův test – A_{340})



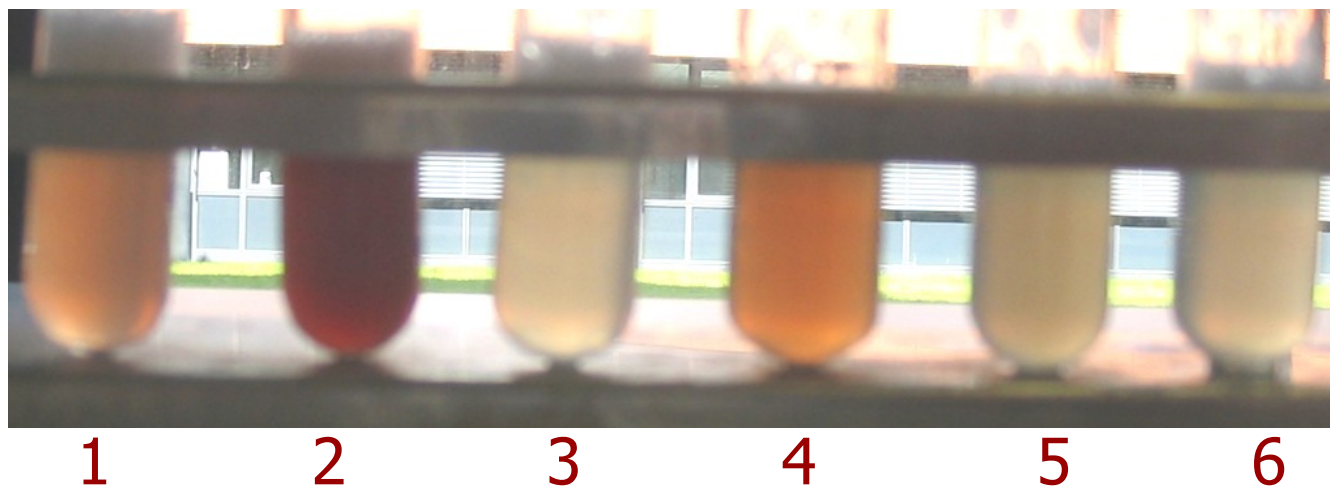
úloha č. 11 – fenoloxidázová reakce



úloha č. 11 - substrátová specifita fenoloxidasy (zbarvení vzorků po 60 min. působení fenoloxidázy)

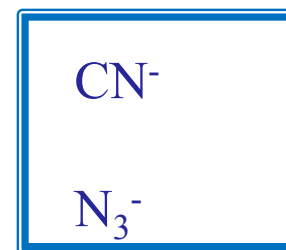
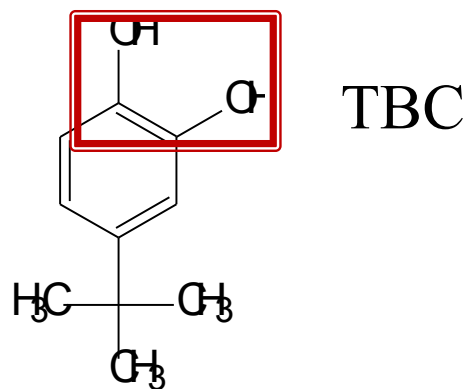
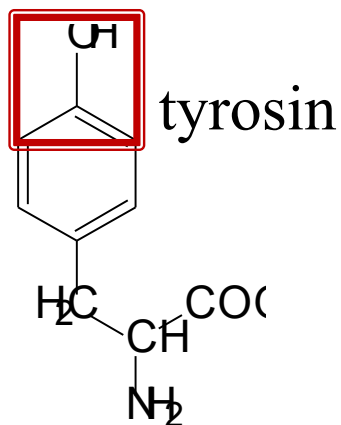
substrát:

- 1 = fenol (hydroxybenzen)
- 2 = pyrokatechol (1,2-dihydroxybenzen)
- 3 = resorcinol (1,3-dihydroxybenzen)
- 4 = hydrochinon (1,4-dihydroxybenzen)
- 5 = 1-naftol
- 6 = 2-naftol

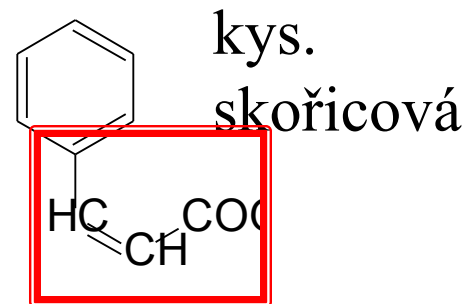
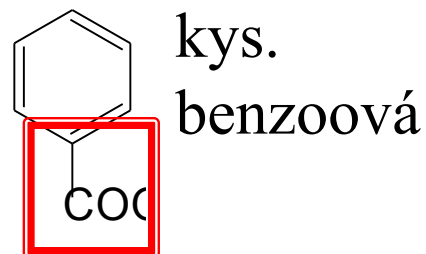
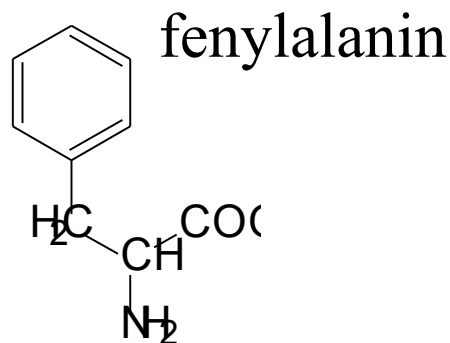


úloha č. 11 – inhibice fenoloxidas

nekompetitivní



kompetitivní



úloha č. 12 – přenos elektronů v respiračním řetězci *P. denitrificans*

experiment 1 (bez membrán) – cíl: nadefinovat neznámé látky jako donory nebo akceptory elektronů

peroxodisíran amonný – oxidační činidlo (akceptor elektronů)

kyselina askorbová – redukční činidlo (donor elektronů)

DCIP (dichlorfenolindofenol) = ?

TMPD (N,N,N',N'tetramethyl-p-fenylendiamin) = ?

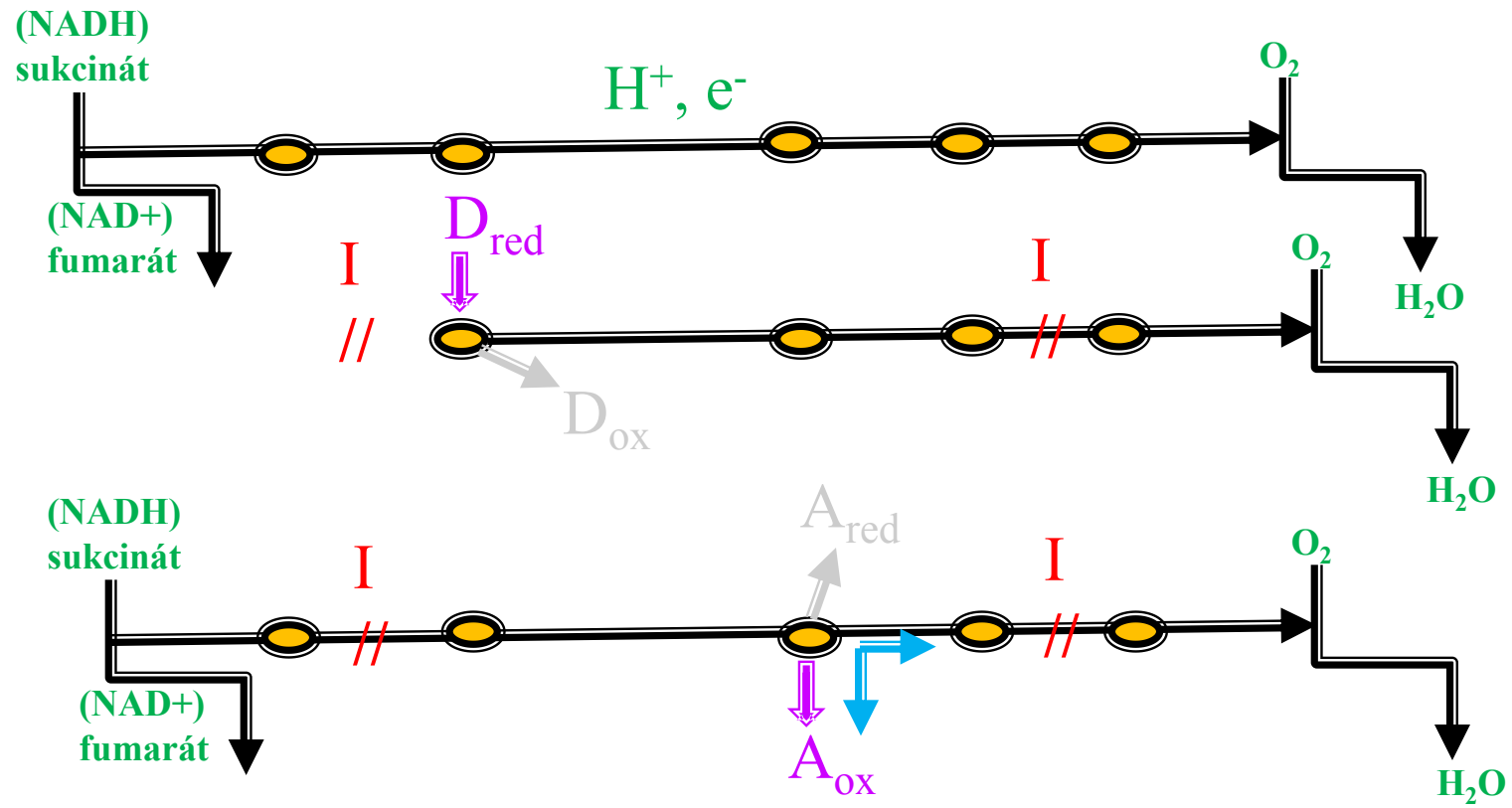
ox + ox \longrightarrow beze změny zbarvení

red + red \longrightarrow beze změny zbarvení

ox + red \longrightarrow změna zbarvení

úloha č. 12 – přenos elektronů v respiračním řetězci *P. denitrificans*

experiment 2-4 (s membránami) – cíl:
lokalizace míst napojení umělých
elektronových donorů/akceptorů a inhibitorů



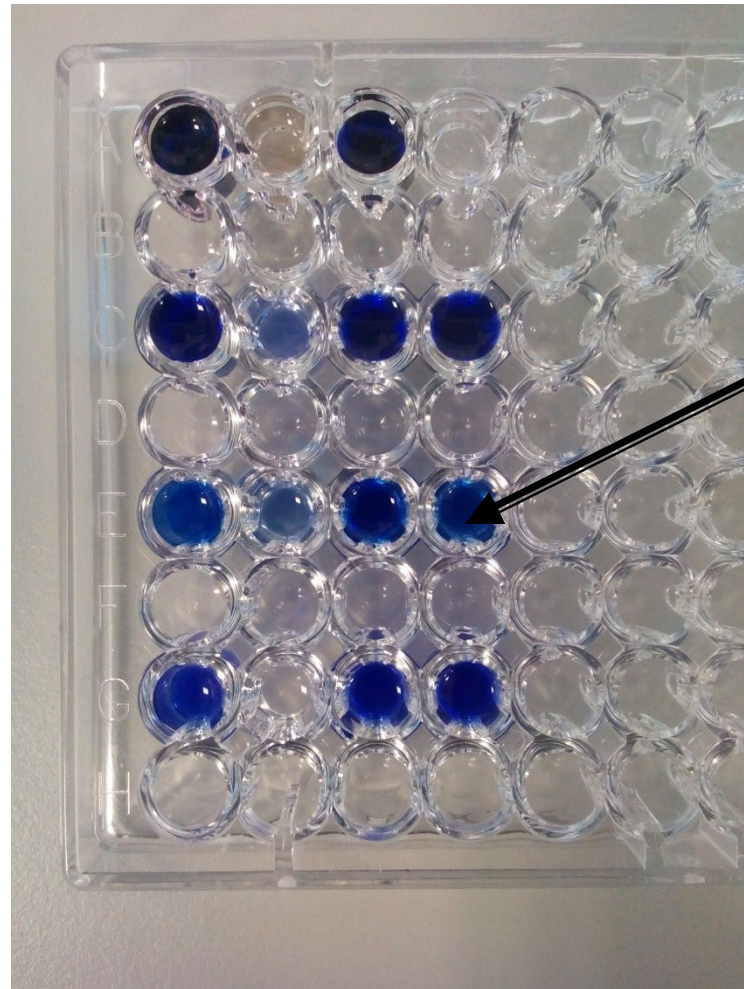
úloha č. 12 – přenos elektronů v respiračním řetězci *P. denitrificans*

experiment 1

experiment 2

experiment 3

experiment 4

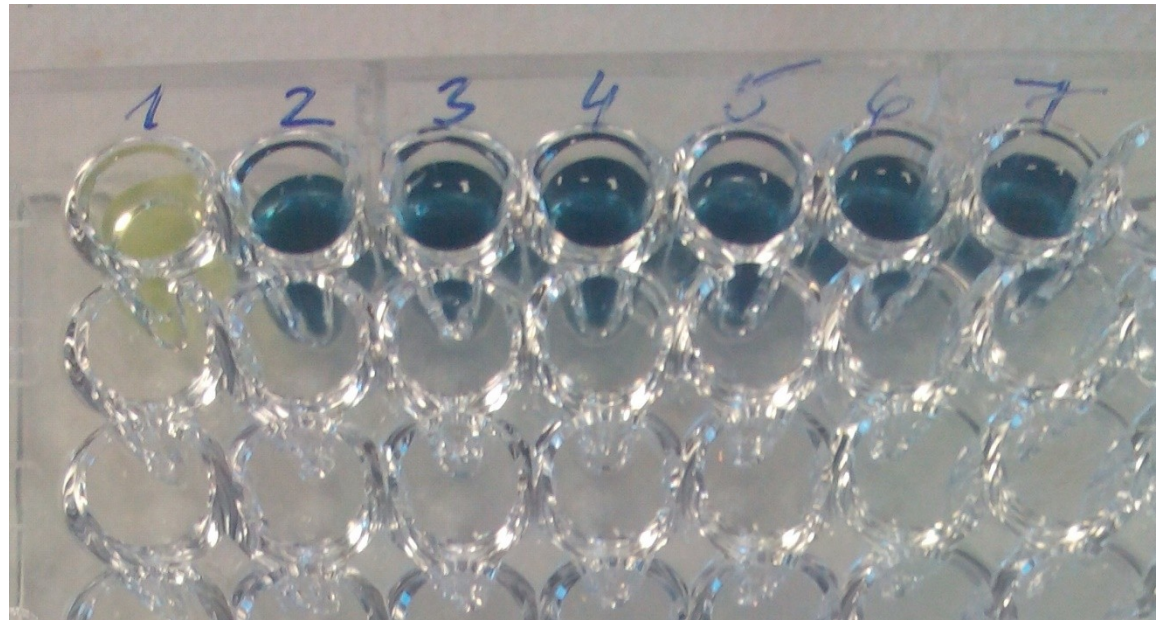


úloha č. 12 – inhibice světelné fáze fotosyntézy diuronem

rostoucí koncentrace diuronu



začátek
experimentu



konec
experimentu
(cca 15 minut
osvětlení)

