

jména:	
obor:	datum provedení:

přílohy protokolu: 2 x graf: kalibrační přímka pro stanovení koncentrace maltosy Somogyiho-Nelsonovou metodou, závislost rychlosti α -amylasové reakce na pH prostředí

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Redukující a neredukující sacharidy. α -amylasová reakce, princip měření α -amylasové aktivity. Rychlost enzymové reakce, aktivita enzymu. Specifická aktivita enzymu. Vliv pH na rychlost enzymové reakce. Chemické výpočty.

Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).

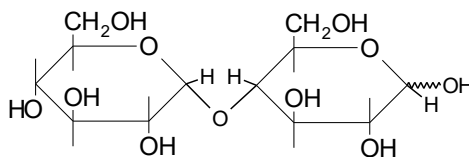
Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen část A.

Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): kalibrační křivka pro stanovení koncentrace maltosy (z části A) + část B.

PRINCIP ÚLOHY

A. Stanovení aktivity α -amylasy

α -amylasa (ptyalin, diastasa, systematický název: 1,4- α -D-glukan.glukanohydrolasa) katalyzuje hydrolýzu 1,4- α -D-glykosidické vazby škrobu (amylosy nebo amylopektinu) a glykogenu. Je aktivována chloridovými, bromidovými nebo jodidovými anionty, rovněž vyžaduje přítomnost vápenatých kationtů. Meziprodukty α -amylasové reakce jsou různé oligosacharidy (dextriny), konečným produktem je disacharid maltosa:



Maltosa (4-O- α -D-glukopyranosyl-D-glukopyranosa) je redukující disacharid skládající se z glukosových podjednotek spojených vazbou jedné alkoholické a jedné poloacetalové hydroxylové skupiny. Zatímco druhá poloacetalová hydroxylová skupina zůstává volná a propůjčuje maltose redukující vlastnosti.

Množství maltosy vzniklé α -amylasovou reakcí lze na základě jejích redukujících vlastností stanovit metodou podle Somogyiho.

Slinné žlázy vylučují sekret (0,5 až 1,5 l denně) obsahující stopová množství řady enzymů (např. cholinesterasu, různé typy proteinas a glykosidas). Vysokou aktivitu však vykazuje především slinná α -amylasa (je izoenzymem pankreatické α -amylasy), která má fyziologický význam v procesu trávení - hydrolyzuje až 70 % škrobu přijatého potravou. α -amylasa je jediný trávicí enzym, který se vyskytuje ve slinách (pro trávení potravy obsahující škrob má však větší význam pankreatická α -amylasa). Aktivita slinné α -amylasy může být stanovena i v krevním séru, což má diagnostický význam - její aktivita v séru je zvýšena při zánětu průdušních slinných žláz (průdušnice). Specifická aktivita slinné α -amylasy se však u dvou různých zdravých jedinců může lišit více než desetinásobně.

Rychlost enzymové reakce lze definovat jako změnu koncentrace substrátu c (mol/l) za čas t (s) podle vzorce: v [$\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$] = dc/dt .

Enzymová aktivita ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) je definována jako limitní rychlost enzymové reakce za definovaných podmínek: saturace enzymu substrátem, pH a teplotní optimum. Aktivitu lze vypočítat vynásobením limitní rychlosti enzymové reakce objemem reakční směsi.

Základní jednotkou enzymové aktivity je katal (kat), což je taková aktivita enzymu, která přemění 1 mol látky za sekundu (**kat = mol/s**). Pro praxi je tato jednotka příliš vysoká, aktivita enzymu se obvykle vyjadřuje v jednotkách μkat (μmol přeměněné látky za sekundu) nebo nkat (nmol přeměněné látky za sekundu). Další možností jak vyjadřovat enzymovou aktivitu je mezinárodní jednotka (IU), která je definována jako $\mu\text{mol}/\text{min}$.

Specifická aktivita enzymu je aktivita vztažená k hmotnosti celkového proteinu např. (kat/mg)..

Aktivita slinné α -amylasy bude v této úloze stanovena pomocí rychlost vzniku maltosy během α -amylasové reakce.

B. pH optimum α -amylasy

Rychlost enzymové reakce závisí na pH. Tato závislost je dána ionizací aminokyselinových zbytků vlivem pH podobně jako u jiných bílkovin. Tato ionizace ovlivňuje terciární strukturu bílkoviny a při extrémních hodnotách může vést i k denaturaci. Hodnota pH dále ovlivňuje například ionizaci substrátu reakce nebo aminokyselin v aktivním centru. Substrát se například může vázat do aktivního místa pouze v protonovaném stavu. Enzymové reakce probíhají limitní (maximální) rychlostí jen při určitém pH prostředí, v tzv. **oblasti pH optima**. pH optimum téhož enzymu se tedy může lišit i v závislosti na konkrétním použitém substrátu. Většina enzymů má pH optimum v neutrální, slabě kyselé nebo slabě alkalické oblasti, časté jsou však výjimky (např. pepsin má pH optimum v oblasti pH 1,5 - 2,5, alkalická fosfatasa při pH kolem 9,5).

PRAKTICKÁ ČÁST A. Stanovení aktivity α -amylasy

Materiál a vybavení:

fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný) s přidavkem 1 mmol.l^{-1} chloridu vápenatého
standardní roztok maltosy ($0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$)

$0,15 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátový pufr pH 7,5

1 % roztok škrobu

Somogyiho-Nelsonovo činidlo I (roztok uhličitanu sodného, vlnanu sodno-draselného a síranu sodného)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo II (roztok síranu měďnatého a síranu sodného)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo III (roztok molybdenanu amonného a hydrogenarseničnanu sodného v kyselině sírové)

Lugolův roztok (roztok jódu a jodidu draselného)

kádinka, pipety, dávkovače, pumpičkové dávkovače, odměrná baňka 10 ml, krátké zkumavky, zátky, Pasteurova pipeta, vortex, stopky, kruhový stojan na zkumavky, hrnec, termostat, fotometr, ledová lázeň

V úloze pracujete s toxickými činidly (zejména Somogyiho-Nelsonovo činidlo III) - pracujte se zvýšenou opatrností!

Postup:

Sestrojení kalibrační závislosti pro stanovení koncentrace maltosy: Nachystejte si sadu 6 zkumavek, které důkladně vypláchnete destilovanou vodou. Podle tabulky připravte sadu šesti roztoků o celkovém objemu 0,5 ml a známé koncentraci maltosy k sestavení kalibrační přímky (zkumavky 1-6). Zkumavka č. 1 maltosu neobsahuje, proto se použije jako slepý vzorek.

zkumavka č.	pipetovaný objem		vypočtená c(mal) [mmol.l ⁻¹]	A ₇₄₀
	0,1 mmol.l ⁻¹ roztok mal [ml]	destil. voda [ml]		
1	0,0	0,5	0,00	0,000
2	0,1	0,4		
3	0,2	0,3		
4	0,3	0,2		
5	0,4	0,1		
6	0,5	0,0		

Používejte pouze dokonale čisté pipety a zkumavky. Stanovení je velmi citlivé, jakákoliv stopa redukujících látek hrubě zkresluje jeho výsledek.

Do všech zkumavek přidejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I, vzorky promíchejte a zahřívejte asi 5 minut na vroucí vodní lázni. Potom přidejte do všech vzorků 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II a zahřívejte na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu (lze chladit pomocí studené vody) přidejte do všech vzorků 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, vzorky promíchejte a ponechte stát po dobu nejméně 2 minut při laboratorní teplotě (a opět promíchejte (vypuzení oxidu uhličitého ze vzorku).

Změřte absorbanci roztoků 2-6 při vlnové délce 740 nm proti slepému vzorku č. 1 (roztoky po měření vracejte do zkumavek), výsledky zapište do tabulky. Při měření absorbance je potřeba sledovat zda se v kyvetách netvoří bublinky CO₂, které zkreslují měření. V případě výskytu bublinek (CO₂) v kyvetách zatřesejte kyvetou jemně o stůl, čímž CO₂ vypudíte. Pokud některá z hodnot absorbance překročila 0,8 (nad touto hodnotou již není závislost absorbance na koncentraci lineární – neplatí Lambert-Beerův zákon) je nutné udělat novou kalibrační přímku, případně tuto hodnotu z kalibrace vynechat.

Příprava enzymového preparátu α -amylasy: Do 10 ml odměrné baňky odpipetujte 1 ml vlastních slin, obsah doplňte po značku fyziologickým roztokem s přidavkem chloridu vápenatého.

Stanovení aktivity α -amylasy: Do 6 krátkých zkumavek (sada A) pipetujte 0,5 ml roztoku škrobu a 2,4 ml fosfátového pufru. Do jedné z nich připipetujte 0,1 ml fyziologického roztoku s přidavkem chloridu vápenatého (její obsah bude sloužit jako kontrola neenzymatického rozkladu škrobu), tuto zkumavku označte A/K (kontrolní vzorek).

Do dalších 6 zkumavek (sada B) dejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I. (Somogyiho-Nelsonovo činidlo I v této sadě zkumavek slouží jednak k ukončení enzymové reakce, jednak ke stanovení vzniklých produktů.) Jednu ze zkumavek označte B/K.

Termostat vytemperujte na teplotu 30 °C. Po ustálení teploty do něj vložte zkumavky sady A a ponechejte temperovat 10 minut. Po uplynutí této doby vložte zkumavky sady B do vroucí vodní lázně.

Zkumavku označenou A/K ponechejte stále v termostatu, uzavřete ji zátkou. Ve zbývajících 5 zkumavkách temperovaných na teplotu 30 °C startujte enzymovou reakci přidavkem 0,1 ml zředěných slin v intervalu 30 s (spustíte stopky, po 30 sekundách startujte přidavkem zředěných slin v první zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, po dalších 30 sekundách startujte přidavkem zředěných slin ve druhé zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, viz tabulka). Přesně po 15 minutách opět v pravidelných intervalech 30 sekund odeberte z každé zkumavky dávkovačem 0,5 ml reakční směsi a pipetujte do zkumavky se Somogyiho-Nelsonovým činidlem I na vroucí vodní lázni (viz tabulka). Dbejte, aby špička pipety zasahovala pod hladinu činidla, nenechávejte vzorek stékat po stěně zkumavky.

Během enzymové reakce zůstávají zkumavky s reakční směsí v termostatu.

Do zkumavky označené písmenem B/K na vroucí vodní lázni přeneste dávkovačem s **čistou špičkou (pozor na kontaminaci slepého vzorku slinami)** 0,5 ml roztoku ze zkumavky obsahující kontrolní vzorek (zkumavka A/K).

Všechny zkumavky ponechejte ve vroucí vodní lázni asi 3 minuty a pak je nechejte chladnout při laboratorní teplotě.

Po odebrání všech vzorků reakčních směsí a kontrolního vzorku uložte jejich zbytky (nepoužité pro stanovení koncentrace maltosy) do ledové lázně (nevyhazujte je).

zkumavka č.	start reakce (přídavek zředěných slin) - čas na stopkách	konec reakce (vnesení vzorku do Somogyiho-Nelsonova činidla I) - čas na stopkách
1	30''	15'30''
2	1'	16'
3	1'30''	16'30''
4	2'	17'
5	2'30''	17'30''

Stanovení koncentrace maltosy v reakčních směsích: Do každé zkumavky sady B (obsahující nyní reakční směs nebo kontrolní vzorek a Somogyiho-Nelsonovo činidlo I) přidejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II, jejich obsah promíchejte a ponechejte je na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Pak zkumavky ochlaďte vodou, přidejte do nich 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, promíchejte, ponechejte stát po dobu nejméně 2 minut při laboratorní teplotě (a opět promíchejte (vypuzení oxidu uhličitého ze vzorku).



Změřte absorbanci vzorků, v nichž probíhala enzymová reakce, proti kontrolnímu vzorku při vlnové délce 740 nm. Jestliže je kontrolní vzorek zakalený, přefiltrujte jej. Při měření absorbance je potřeba sledovat zda se v kyvetách netvoří bublinky CO_2 , které zkreslují měření. V případě výskytu bublinek (CO_2) v kyvetách zařukejte kyvetou jemně o stůl, čímž CO_2 vypudíte. Překračují-li absorbance některých vzorků hodnotu 0,8, vzorky definovaným způsobem nařeďte vodou (zvolte vhodné násobné ředění) a znovu změřte proti stejným způsobem zředěnému kontrolnímu vzorku.

Do zbytků reakčních směsí a kontrolního vzorku přidejte pomocí Pasteurovy pipety kapku Lugolova roztoku, promíchejte. Srovnajte zbarvení vzorků, v nichž probíhala enzymová reakce, se zbarvením kontrolního vzorku.

Vyhodnocení:

Vypočítejte koncentrace maltosy ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky v části Postup. Sestrojte kalibrační graf (závislost A_{740} na koncentraci maltosy ve zkumavce).

Uveďte následující údaje a tabulku doplněnou experimentálními a vypočtenými údaji:

- objem reakční směsi (ml):
- doba reakce (min):
- objem neředěných slin obsažených v reakční směsi (ml):

zkumavka č.	A_{740}	$\emptyset A_{740}$	c(maltosy) ve vzorku pro fotometrii* [mmol.l ⁻¹]	ředění vzorku pro fotometrii	c(maltosy) v reakční směsi** [mmol.l ⁻¹]
1					
2					
3					
4					
5					

*) při výpočtu koncentrace maltosy použijte kalibrační graf

**) koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii

n (maltosy) v reakční směsi [μmol]	aktivita amylasy [μmol.min ⁻¹]*	specifická aktivita amylasy [μmol.min ⁻¹ .ml ⁻¹]**
	[nkat]	[nkat.ml ⁻¹]

*) v celém objemu reakční směsi

**) aktivita vztahovaná na ml slin

Uveďte zbarvení vzorků (po přidavku Lugolova roztoku) v nichž probíhala enzymová reakce, a zbarvení kontrolního vzorku.

Rozdíl vysvětlete:

Praktická část B. pH optimum α -amylasy

Materiál a vybavení:

0,1 mol.l⁻¹ kys. citronová

0,2 mol.l⁻¹ Na₂HPO₄

standardní pufrы pH 4, pH 7a pH 9

fyzilogický roztok (0,9 % chlorid sodný) s přidavkem 1 mmol.l⁻¹ chloridu vápenatého

1 % roztok škrobu

Somogyiho-Nelsonovo činidlo I (roztok uhličitanu sodného, vlnanu sodno-draselného a síranu sodného)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo II (roztok síranu měďnatého a síranu sodného)

Somogyiho-Nelsonovo činidlo III (roztok molybdenanu amonného a hydrogenarseničnanu sodného v kyselině sírové)

Lugolův roztok (roztok jódu a jodidu draselného)

pipety, odměrný válec 25 ml, titrační baňky, pH-metr, kádinka, odměrná baňka 10 ml

krátké zkumavky, zátky, dávkovače, pumpičkové dávkovače, Pasteurova pipeta, vortex, stopky, kruhový stojan na zkumavky, hrnec, kahan a trojnožka nebo vaříč, termostat, fotometr, ledová lázeň

V úloze pracujete s toxickými činidly (zejména Somogyiho-Nelsonovo činidlo III) - pracujte se zvýšenou opatrností!

Postup:

Příprava sady pufrů s různým pH: Do odměrného válce nalijte 0,2 mol/l hydrogenfosforečnan sodný podle rozpisu a doplňte 0,1 mol/l kyselinou citronovou na celkový objem 25 ml. Připravený pufr přelijte do označené titrační baňky.

baňka č.	0,2 mol/l hydrogenfosforečnan disodný (ml)	přibližná teoretická hodnota pH pufru	hodnota pH pufru stanovená pH-metrem
1	5,0	3,0	
2	8,8	4,0	
3	12,5	4,8	
4	14,0	5,4	
5	15,0	5,8	
6	18,1	6,6	
7	20,6	7,0	
8	23,4	7,6	
9	24,3	8,0	
10	25,0	8,5	

pH připravených pufrů zjistěte pH-metrem.

Příprava enzymového preparátu α -amylasy: Do 10 ml odměrné baňky odpipetujte 1 ml vlastních slin, obsah doplňte po značku fyziologickým roztokem s přidavkem chloridu vápenatého.

Stanovení aktivity α -amylasy: Do 10 krátkých zkumavek (sada A) pipetujte dávkovačem 0,5 ml roztoku škrobu, každé z nich přidejte 2,4 ml pufru s různým pH - zkumavky označte čísly 1 – 10 a hodnotou pH pufru. Do dalších 10 zkumavek (sada B) označených stejně jako zkumavky sady A dejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I. (Somogyiho-Nelsonovo činidlo I v této sadě zkumavek slouží jednak k ukončení enzymové reakce, jednak ke stanovení vzniklých produktů.)

Termostat vytemperujte na teplotu 30 °C. Po ustálení teploty do něj vložte zkumavky sady A a ponechejte temperovat 10 minut. Po uplynutí této doby vložte zkumavky sady B do vroucí vodní lázně.

Ve zkumavkách sady A temperovaných na teplotu 30 °C startujte enzymovou reakci přidavkem 0,1 ml zředěných slin v intervalu 30 s (spusťte stopky, po 30 sekundách startujte přidavkem zředěných slin v první zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, po dalších 30 sekundách startujte přidavkem zředěných slin ve druhé zkumavce, reakční směs promíchejte, stopky nevypínejte, viz tabulka). Přesně po 15 minutách opět v pravidelných intervalech 30 sekund odeberte z každé zkumavky dávkovačem 0,5 ml reakční směsi a pipetujte do příslušné zkumavky sady B se Somogyiho-Nelsonovým činidlem I na vroucí vodní lázni (viz tabulka). Dbejte, aby špička pipety zasahovala pod hladinu činidla, nenechávejte vzorek stékat po stěně zkumavky.

Během enzymové reakce zůstávají zkumavky s reakční směsí v termostatu.

Po odebrání všech vzorků reakčních směsí uložte jejich zbytky (nepoužité pro stanovení koncentrace maltosy) do ledové lázně (nevyhazujte je).

Připravte slepý vzorek pro fotometrii – v označené zkumavce smíchejte 0,5 ml vody a 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I. Zkumavku vložte do vroucí vodní lázně.

Všechny zkumavky ponechejte ve vroucí vodní lázni asi 3 minuty a pak je nechejte chladnout při laboratorní teplotě.

zkumavka (pH)	start reakce (přídavek zředěných slin) - čas na stopkách	konec reakce (vnese ní vzorku do Somogyiho- Nelsonova činidla I) - čas na stopkách
3,0	30''	15'30'
4,0	1'	16'
4,8	1'30''	16'30''
5,4	2'	17'
5,8	2'30''	17'30''
6,6	3'	18'
7,0	3'30''	18'30''
7,6	4'	19'
8,0	4'30''	19'30''
8,5	5'	20'

Stanovení koncentrace maltosy v reakčních směsích: Do každé zkumavky sady B (obsahující nyní reakční směs nebo vodu a Somogyiho-Nelsonovo činidlo I) přidejte 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla II, jejich obsah promíchejte a ponechejte je na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Pak zkumavky ochlaďte vodou, přidejte do nich 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, promíchejte, ponechejte stát po dobu nejméně 2 minut při laboratorní teplotě a opět promíchejte (vypuzení oxidu uhličitého ze vzorku).

Změřte absorbanci vzorků, v nichž probíhala enzymová reakce, proti slepému vzorku při vlnové délce 740 nm. Překračují-li absorbance některých vzorků hodnotu 0,8, **všechny** vzorky definovaným způsobem nařed'te vodou (zvolte vhodné násobné ředění) a znovu změřte proti stejným způsobem zředěnému slepému vzorku.

Do zbytků reakčních směsí a přidejte pomocí Pasteurovy pipety kapku Lugolova roztoku, promíchejte. Pozorujte zbarvení vzorků a jeho intenzitu v závislosti na pH reakční směsi. Pokud nemáte k dispozici kontrolní vzorek obsahující nerozštěpený škrob z části úlohy A, připravte si jej smícháním 0,5 ml roztoku škrobu a 1,5 ml vody.

Vyhodnocení:

Uveďte následující údaje a tabulku doplněnou experimentálními a vypočtenými údaji:

- doba reakce (min):

zkumavka č.	A ₇₄₀	c(maltosy) ve vzorku pro fotometrii* [mmol.l ⁻¹]	ředění vzorku pro fotometrii	c(maltosy) v reakční směsi** [mmol.l ⁻¹]
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

*) při výpočtu koncentrace maltosy použijte kalibrační graf

***) koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii

zkumavka č.	pH (zjištěné pH metrem)	c (maltosy) v reakční směsi [μ mol.l ⁻¹]	V _{vzniku} (maltosy) [μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹]	zbarvení reakčních směsí po přidání Lugolova roztoku
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
<i>pH optimum</i>			V _{vzniku} (maltosy) [μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹]	

Do grafu vynesete závislost rychlosti vzniku maltosy na pH prostředí. Uveďte, při kterém pH probíhala α -amylasová reakce nejrychleji:

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:

ÚLOHA 7A - kalibrační graf

zkumavka č.	A ₇₄₀
1	0,000
2	
3	
4	
5	
6	

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 7A - stanovení aktivity α -amylasy

zkumavka č.	ředění vzorku pro fotometrii	A ₇₄₀ zředěného vzorku	zbarvení reakčních směsí po přidání Lugolova roztoku
1			
2			
3			
4			
5			

zbarvení kontrolního vzorku po přidání Lugolova roztoku:

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 7B

pH (zjištěné pH metrem)	ředění vzorku pro fotometrii	A ₇₄₀ zředěného vzorku	zbarvení reakčních směsí po přidání Lugolova roztoku

Podpis vedoucího cvičení: