

jména:	
obor:	datum provedení:

přílohy protokolu:

graf: závislost rychlosti α -amylasové reakce na pH prostředí

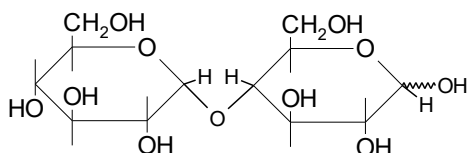
OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

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.

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 jejich 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 isoenzymem 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 .

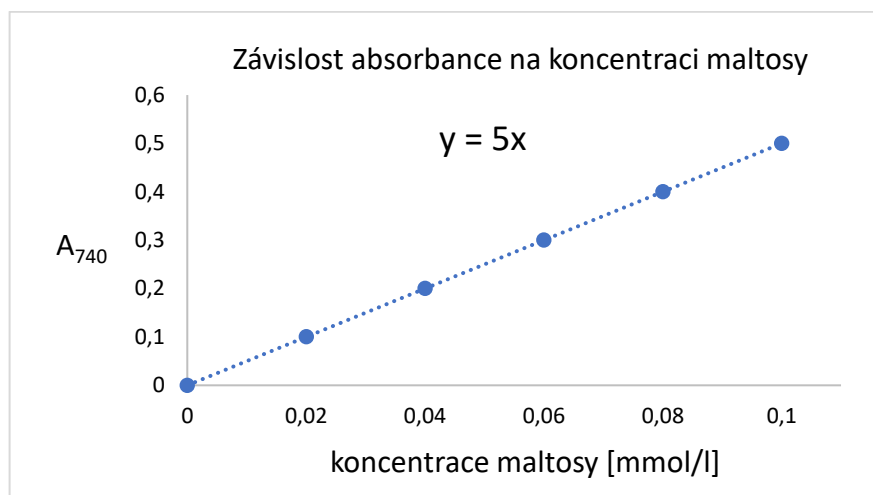
Enzymová aktivita (mol s^{-1}) je definována jako limitní rychlost enzymové reakce za definovaných podmínek: saturace enzymu substrátem, pH a teplotní optimum. Aktivitu lze vypočítat vynásobením limitní rychlosti enzymové reakce objemem reakční směsi.

Základní jednotkou enzymové aktivity je katal (kat), což je taková aktivita (množství v daném systému) 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 enzymová jednotka (U), která je definována jako $\mu\text{mol}/\text{min}$.

Specifická aktivita enzymu je aktivita vztažená např. k hmotnosti celkového proteinu (např. nkat/mg) či k objemu (např. nkat/ml) nebo hmotnosti (např. nkat/mg) biologického vzorku.

Aktivita slinné α -amylasy bude v této úloze stanovena pomocí rychlosti vzniku maltosy během α -amylasové reakce. Pro přepočítání absorbance na koncentraci maltosy využijte níže **přiloženou kalibrační přímku**.



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. Ionizace aminokyselinových zbytků ovlivňuje terciární strukturu bílkoviny a při extrémních hodnotách může vést i k její 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 zase při pH kolem 9,5).

PRAKTICKÁ ČÁST A. Stanovení aktivity α -amylasy.

Materiál a vybavení:

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

fosfátový pufr ($0,15 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) 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),
proto pracujte se zvýšenou opatrností!**

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

Postup:

Příprava enzymového preparátu α -amylasy:

Do odměrné baňky o objemu 10 ml pipetujte 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 pipetujte 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 $30 \text{ }^\circ\text{C}$. 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 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 0,5 ml reakční směsi a pipetujte do zkumavky se Somogyiho-Nelsonovým činidlem I na vroucí vodní lázni (vizte 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 pipetou 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.

Po odebrání všech vzorků reakčních směsí a kontrolního vzorku (ze sady A) 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 směších: 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 ponechte je na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Pak zkumavky ochlaďte vodou na laboratorní teplotu, přidejte do nich 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, promíchejte, ponechte 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 zaťukajte 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 (sada A) přidejte pomocí Pasteurovy pipety kapku Lugolova roztoku, promíchejte. Srovnajte zbarvení vzorků, v nichž probíhala enzymová reakce, se zbarvením kontrolního vzorku.

Vyhodnocení:

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]	Zbarvení vzorků po přidání Lugolova roztoku
1						
2						
3						
4						
5						
kontrola	0	0				

* při výpočtu koncentrace maltosy použijte **kalibrační graf z teoretické části**

** koncentrace redukujících sacharidů vynásobená ředěním pro fotometrii

n maltosy v reakční směsi [μmol]	aktivita amylasy [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$]*	specifická aktivita amylasy [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ **]
	[nkat]	[nkat $\cdot\text{ml}^{-1}$]

* v celém objemu reakční směsi

** aktivita vztažená na ml slin

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

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 7 a 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, vínanu 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

zkumavky, hrnec, vařič, termostat, fotometr, ledová lázeň

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

Postup:

Příprava sady pufrů s různým pH:

Do odměrného válce nalijte hydrogenfosforečnan sodný (0,2 mol/l) podle rozpisu a doplňte kyselinou citronovou (0,1 mol/l) na celkový objem 25 ml. Připravený pufr přelijte do označené titrační baňky.

baňka č.	0,2 mol/l hydrogenfosforečnan sodný (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	

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.

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

Stanovení aktivity α -amylasy:

Do 10 krátkých zkumavek (sada A) pipetujte 0,5 ml roztoku škrobu, do 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 0,5 ml reakční směsi a pipetujte do příslušné zkumavky sady B se Somogyiho-Nelsonovým činidlem I na vroucí vodní lázni (vizte 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 (ze sady A) 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 ponechte ve vroucí vodní lázni asi 3 minuty.

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 ponechte je na vroucí vodní lázni dalších 10 minut. Pak zkumavky ochlaďte vodou na laboratorní teplotu, přidejte do nich 2 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III, promíchejte, ponechte 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 včetně toho slepého** nařeďte definovaným způsobem vodou (zvolte vhodné násobné ředění) a znovu změřte.

Do zbytků reakčních směsí (sada A) 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 z teoretické části**

** 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 8A

zkumavka č.	ředění vzorku pro fotometrii	A_{740} zředěného vzorku	zbarvení reakčních směsí a kontrolního vzorku po přidání Lugolova roztoku
1			
2			
3			
4			
5			
kontrola			

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 8B

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

Podpis vedoucího cvičení: