

Instrukcja do ćwiczenia 3

BADANIE WŁASNOŚCI ENZYMÓW

ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- Zasady klasyfikacji enzymów, główne klasy z przykładami, rola hydrolaz w metabolizmie: np. glikozydaz (amylaz, disacharydaz), lipaz, proteaz
- Kinetyka enzymatyczna: wpływ stężenia enzymu, substratu, produktu, pH, temperatury, aktywatorów, inhibitorów na aktywność enzymów
- Enzymy trawienne przewodu pokarmowego

1. Przygotowanie roztworu amylazy śliny własnej

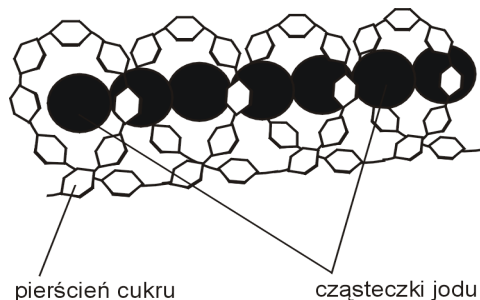
Usta przepłukać wodą o temp około 40°C. Następnie pobrać do ust 20 mililitrów H₂O destylowanej i po 2 minutach wypłuć wodę do zlewki.

2. Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji hydrolizy skrobi przez amylazę

Zasada: Enzymy katalizują reakcje w optymalnych warunkach, pod względem stężenia substratu, ilości enzymu, temperatury, pH środowiska reakcji, obecności aktywatorów i inhibitorów. W odpowiednich warunkach, przy stałym stężeniu substratu, oznaczana szybkość reakcji jest proporcjonalna do ilości enzymu obecnego w próbce.

Ponieważ zmiany aktywności enzymów w płynach biologicznych (np. surowica, mocz) często są odzwierciedleniem zmian patologicznych zachodzących w narządach, w celach diagnostycznych oznacza się stężenie wielu enzymów, np. fosfatazy alkalicznej i kwaśnej, dehydrogenazy mleczanowej, kinazy kreatynowej, cholinesterazy, aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej i innych. Część z nich to tzw. **enzymy wskaźnikowe**, które pojawiają się w dużych ilościach po uszkodzeniu określonych narządów.

W ćwiczeniach będziemy analizować przebieg reakcji hydrolizy skrobi przez amylazę ślinową. Przebieg reakcji będziemy obserwować na podstawie zaniku zabarwienia z jodem jakie daje skrobia. Amyloza (jeden ze składników skrobi) tworzy kompleks z jodem o barwie niebieskiej, którą zawdzięcza temu, że ma strukturę uporządkowanej helisy, z pustym wnętrzem wypełnionym jodem. Zabarwienie nie jest wynikiem reakcji chemicznej, lecz skutkiem uwięzienia cząsteczek jodu wewnątrz helisy. Jod wewnątrz helisy znajduje się w odmiennym otoczeniu niż w roztworze i ma inną barwę. Za koniec reakcji hydrolizy skrobi przyjmujemy moment w którym znika zabarwienie, ponieważ cała skrobia uległa hydrolizie do achrodekstryn, które nie dają zabarwienia z jodem - jest to tzw. **punkt achromowy**.



Wykonanie:

6 probówek w statywie opisz nr od 1 do 6 i wprowadź do nich kolejno roztwory wg instrukcji w tabeli:

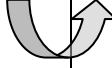




Numer probówki	1	2	3	4	5	6
Roztwór (ml)						
Bufor uniwersalny o pH7	1	1,34	1,5	1,6	1,67	1,71
1% roztwór skrobi (20 nM/ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,9% NaCl	1	1	1	1	1	1
0,002% płyn Lugola	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Wymieszać zawartość probówek. Dodać roztwór amylazy do pierwszej probówki (w ilości podanej poniżej) i równocześnie rozpocząć mierzenie czasu. Mieszając obserwować odbarwienie się próby do momentu osiągnięcia punktu achromowego. Zapisać czas reakcji (t) w tabeli wyników. Podobnie postąpić w przypadku pozostałych probówek, zmieniając jedynie ilość roztworu amylazy.						
Roztwór amylazy śliny	1	0,66	0,5	0,4	0,33	0,29
Stopień rozcieńczenia roztworu amylazy względem buforu	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6

1. Sporządź wykres zależności szybkości reakcji hydrolizy skrobi ($V = nM \text{ substratu} / T_{(\min)}$) od stopnia rozcieńczenia roztworu amylazy względem buforu (od 1:6 do 1:1) przy stałym stężeniu substratu w próbce, zinterpretuj uzyskane wyniki.

3. Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji hydrolizy skrobi przez amylazę

Wykonanie:

5 probówek w statywie opis� nr od 1 do 5 i wprowadź do nich kolejno roztwory wg instrukcji w tabeli:

Numer probówki	1	2	3	4	5
Roztwór (ml)					
Bufor uniwersalny o pH7	1	1	1	1	1
1% roztwór skrobi (20 nM/ml)	1				
Po wymieszaniu przenieść 1 ml z probówki nr1 do probówki nr2. Następnie przenieść 1 ml z probówki 2 do probówki 3 itd. Z ostatniej probówki wylać 1 ml roztworu do zlewu.					
0,9% NaCl	1	1	1	1	1
0,002% plyn Lugola	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Wymieszać zawartość probówek. Dodać roztwór amylazy do pierwszej probówki (w ilości podanej poniżej) i równocześnie rozpocząć mierzenie czasu. Mieszając obserwować odbarwienie się próby do momentu osiągnięcia punktu achromowego. Zapisać czas reakcji (t) w tabeli wyników. Podobnie postąpić w przypadku pozostałych probówek.					
Roztwór amylazy śliny	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Stopień rozcieńczenia roztworu skrobi	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32

1. Sporządź wykres zależności szybkości reakcji hydrolizy skrobi ($V=nM \text{ substratu}/T_{(\min)}$) od ilości substratu (stężenie w nM/probóje) przy stałej ilości enzymu, zinterpretuj uzyskane wyniki.

4. Wpływ temperatury mieszaniny reakcyjnej na szybkość reakcji enzymatycznej

Wykonanie:

3 probówki w statywie opis� nr od 1 do 3 i wprowadź do nich kolejno roztwory wg instrukcji w tabeli:

Numer probówki	1	2	3
Roztwór (ml)			
Bufor uniwersalny o pH7	1	1	1
1% roztwór skrobi (10 nM)	0,5	0,5	0,5
0,002% plyn Lugola	0,125	0,125	0,125
Inkubacja w temp	4 ⁰ C	pokojoyej	40 ⁰
Wymieszać zawartość probówek i umieścić w odpowiedniej temperaturze. Dodać roztwór amylazy do pierwszej probówki (w ilości podanej poniżej) i równocześnie rozpocząć mierzenie czasu. Mieszając obserwować odbarwienie się próby do momentu osiągnięcia punktu achromowego. Zapisać czas reakcji (t) w tabeli wyników.			
Roztwór amylazy śliny	1	1	1

1. Sporządź wykres zależności szybkości reakcji hydrolizy skrobi ($V=nM \text{ substratu}/T_{(\min)}$) od temperatury mieszaniny reakcyjnej, zinterpretuj uzyskane wyniki.

Polecana literatura:

1. Biochemia. Krótkie wykłady. Hames BD, Hooper NM. PWN. Sekcja C – Enzymy.
2. Ćwiczenia z Biochemii pod redakcją L. Kłyszajko-Stefanowicz. PWN. Rozdział Enzymy
3. Biochemia kliniczna. Angielski S, Jakubowski Z, Dominiczak M. Perseusz.

TABELE WYNIKÓW - ENZYMY

Ćw 2

Nr próbówki	T roboczy	T _(min)	Rozcieńczenie enzymu (oś X)	V=nM substratu/ T _(min) (oś Y)
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				

Ćw 3

Nr próbówki	T roboczy	T _(min)	[S] ilość moli substratu (nM) (oś X)	V=nM substratu/ T _(min) (oś Y)
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				

Ćw 4

Nr próbówki	T roboczy	T _(min)	Temperatura (oś X)	V=nM substratu/ T _(min) (oś Y)
1.				
2.				
3.				