NÁVODY NA LABORATORNÍ CVIČENÍ: BIOCHEMIE I

Jméno:

_____

OBSAH

ÚVOD DO SPEKTROFOTOMETRIE 2

1. Určení schopnosti vzorků absorbovat UV/viditelné světlo 2

2. Změření a porovnání hodnot absorbancí v absorpčním spektru dvou odlišně koncentrovaných vzorků Evansova roztoku 3

3. Kazuistiky 4

OPTICKÉ METODY – SPEKTROFOTOMETRIE 5

1. Ověření platnost Lambertova-Beerova zákona v zadaném rozsahu koncentrací kalibrační řady roztoků Fe^{2+} 5

2. Určení koncentrace Fe^{2+} v neznámém vzorku výpočtem z kalibrační křivky 6

3. Porovnejte přístupy vhodné pro určení koncentrace Fe^{2+} 7

ELEKTROCHEMICKÉ METODY - POTENCIOMETRIE 8

1. Kalibrace pH metru 8

2. Stanovení koncentrace kyseliny octové v octu potenciometrickou titrací 8

OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKŮ LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ 11

1. Test vlastní preciznosti pipetování při přípravě roztoků ředěním 11

2. Zhodnocení preciznosti (precision) a pravdivosti (trueness) vaší práce 12

SPECIFIČNOST ENZYMOVÉ ÚČINNOSTI A VLIV PROSTŘEDÍ 14

1. Stanovení optimálního pH pro β-fruktofuranozidázu 14

2. Vliv teploty 15

3. Vliv koncentrace enzymu 16

4. Určení enzymové specifičnosti 16

ÚVOD DO SPEKTROFOTOMETRIE

Datum:

ÚKOLY

1. Určete, zda předložené vzorky látek absorbují UV / viditelné světlo
2. Změřte a porovnejte hodnoty absorbancí v absorpčním spektru dvou odlišně koncentrovaných vzorků Evansova roztoku
3. Vyřešte kasuistiky

1. Určení schopnosti vzorků absorbovat UV/viditelné světlo

U předložených vzorků zapište, zda jsou barevné, pokud ano, odhadněte přibližně jejich absorpční maximum a porovnejte s výsledky měření spektra pomocí spektrofotometru.

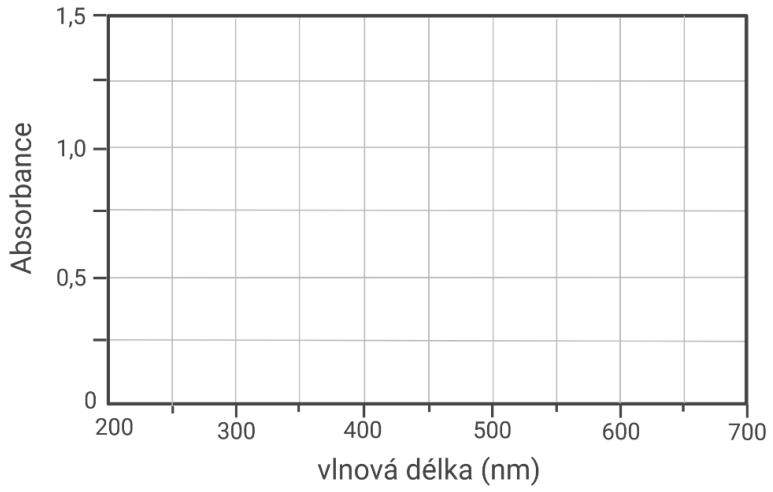
Provedení:

- Zapněte spektrofotometr. Na displeji spektrofotometru vyberte z nabízených možností variantu „**Scan**“. Poté stiskněte úlohu s názvem „**praktikum 1/1**“.
- Připravte si 3 kyvety-nedržíme je za hladké stěny! Do první kyvety napipetujte **2 ml destilované vody**. Buničinovým čtverečkem očistěte průhledné strany kyvety a vložte ji do spektrofotometru. Stiskněte **„Blank**“, kterým přístroj vynulujete.
- Do druhé kyvety napipetujte **2 ml roztoku albuminu** a stiskněte **„Measure“** proměřte absorpční spektrum. Opět vložte kyvetu s destilovanou vodou a přístroj vynulujte.
- Pokračujte s měřením **roztoku glukózy a Evansova roztoku**, použijte vždy suchou kyvetu. Mezi měřeními vynulujte přístroj (**„Blank**“) na destilovanou vodu.
- Do tabulky zaznamenejte absorpční maximum pro každou látku.

Látka	**Barva roztoku**	**Oblast absorpce UV/VIS/NENÍ ***		**Absorpční max (nm)**
	-	Odhad	Měření	
Albumin				
Glukóza				
Evansův roztok				

***** *Vyberte jednu z nabízených možností*

Vyfoťte si křivky absorpčních maxim a obrázek vložte nebo je načrtněte do připraveného rastru. Porovnejte odhadnuté a naměřené hodnoty.



2. Změření a porovnání hodnot absorbancí v absorpčním spektru dvou odlišně koncentrovaných vzorků Evansova roztoku

Provedení:

- Budete porovnávat absorbanci dvou vzorků. Neředěný vzorek č.1 (zásobní Evansův roztok) máte připravený již z prvního úkolu v kyvetě.
- Naředťe si zásobní Evansův roztok 5x vodou, tak abyste získali celkem 2ml zředěného roztoku (vzorek č. 2). Použijte pipetu a vzorky poté promíchejte.
- Na displeji spektrofotometru vyberte z nabízených možností variantu **Scan**. Poté stiskněte předem uloženou úlohu s názvem „**praktikum 1/2**".
- Vynulujte přístroj na slepý vzorek – kyvetu s destilovanou vodou. Stiskněte „**Blank**".
- Proměřte absorpční spektrum **roztoku č. 1**. Poté jej vylijte a propláchněte malým množstvím ředěného vzorku a osušte na buničině.
- Proměřte absorpční spektrum **roztoku č. 2.**

	Evansův roztok zásobní (ml)	**Voda (ml)**	**Celkový objem (ml)**	**Absorpční maximum (nm)**	**Absorbance ve vlnové délce maxima**
Vzorek č. 1	2 ml	-	2 ml		
Vzorek č. 2 Evansův roztok ředěný vodou 1:4			2 ml		

Porovnejte absorpční spektra, absorpční maxima a absorbance v absorpčním maximu ředěného a neředěného roztoku a hodnoty vepište do tabulky.

Závěr:

Shrňte výsledky vašeho měření, ke zhodnocení vám mohou pomoci následující otázky:

Vyhodnocení a interpretace výsledků úkolu č. 1:

Odhadli jste před měřením, zda látky absorbují světlo?
Jak souvisí barva Evansova roztoku s jeho absorpčním spektrem?
Uveďte příklady dalších organických látek v těle, které absorbují a neabsorbují viditelné světlo.

Vyhodnocení a interpretace výsledků úkolu č. 2

Jak se změnila absorbance a absorpční maximum při zředění Evansova roztoku?

3. Kazuistiky

Od asistenta obdržíte kartičku s kazuistikou.

1. Na základě vašich znalostí a informací uvedených v kazuistice stručně vysvětlete princip ochrany opalovacích krémů. Odpovězte na otázky uvedené na kartičce s kazuistikou.

2. Na základě znalostí o absorpčních spektrech molekul vysvětlete změny barvy hematomu.

OPTICKÉ METODY – SPEKTROFOTOMETRIE

Datum:

ÚKOLY

1. Ověřte platnost Lambertova-Beerova zákona pomocí kalibrační řady roztoků Fe^{2+}
2. Stanovte koncentraci Fe^{2+} iontů v neznámém vzorku pomocí kalibrační křivky
3. Porovnejte dva přístupy pro určení koncentrace Fe^{2+}

1. Ověření platnost Lambertova-Beerova zákona v zadaném rozsahu koncentrací kalibrační řady roztoků Fe^{2+}

Princip stanovení: Fe^{2+} jsou ve zředěných roztocích téměř bezbarvé. S 2,2'-bipyridinem (dipyridinem) reagují kvantitativně a poskytují červeně zbarvený komplex s absorpčním maximem 520 nm.

Dle následujícího postupu připravíte kalibrační řadu vzorků naředěním **zásobního roztoku Fe^{2+} o koncentraci 350 µmol.l^{-1}.**

Provedení:

- Připravte si osm 50 ml odměrných baněk. Nadepište je číslem vzorku 1-8 tak jak je uvedeno v tabulce. Vzorek č. 1 slouží jako blank. Kalibrační řadu budou tvořit vzorky 2-6. Odměrné baňky označené 7 a 8 jsou určeny pro neznámé vzorky z úkolu č.2.
- Skleněnou pipetou přidejte do každé baňky s číslem vzorku 2-6 odpovídající množství zásobního roztoku Fe^{2+} (viz tabulka).
- Do baněk 7 a 8 skleněnou pipetou odměřte odpovídající množství neznámého vzorku.
- Pomocí dávkovače přidejte do všech baněk dipyridin (činidlo) a následně acetátový pufr. Do každé baňky nalijte z kádinky destilovanou vodou asi centimetr pod rysku. Pomocí střičky nebo kapátka doplňte vodu přesně po rysku. Baňku uzavřete zátkou a důkladně promíchejte.
- Změřte a vepište do tabulky absorbanci vzorků při 520 nm. Při měření postupujte od vzorku s nejnižší koncentrací, na závěr pak změřte absorbance ředěného neznámého vzorku. Mezi měřeními nevyplachujte kyvetu vodou, ale malým množstvím vzorku, který budete měřit jako následující.

Číslo baňky	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Roztok Fe^{2+} (ml)	**-**	**2**	**5**	**10**	**15**	**20**	**-**	**-**
Neznámý vzorek (ml)	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**0,5**	**5**
Činidlo (ml)	**0,5**							
Acetátový pufr (ml)	**5**							
Voda (ml)	Doplňte po rysku (50 ml)							
Absorbance								
Vypočítaná koncentrace Fe^{2+} (µmol.l^{-1})							-	-

Vyhodnocení:

- V Excelu vytvořte tabulku, která bude obsahovat vypočítané koncentrace Fe^{2+} a naměřené absorbance. Sestrojte **bodový graf a hodnoty proložte přímkou**.
- Proložení bodů: klikněte pravým tlačítkem myši na libovolný bod v grafu a vyberte položku **Formát spojnice trendu.** V kartě Formát spojnice trendu vyberte **lineární**, zaškrtněte políčka **Zobrazit rovnici grafu** a **zobrazit korelační koeficient R**. Údaje zapište do protokolu.

Rovnice přímky:

Korelační koeficient:

- Zhodnoťte vaši kalibrační přímku, všímejte si její linearity, identifikujte **odlehlé body** (bod výrazně mimo přímku). Pokud je třeba odlehlé body odstraňte a důvody odstranění uveďte v závěru. Pokud jste upravili body znovu si zapište si rovnici přímky a korelační koeficient.

Rovnice přímky (upravená):

Korelační koeficient:

2. Určení koncentrace Fe^{2+} v neznámém vzorku výpočtem z kalibrační křivky

Vzhledem k tomu, že koncentraci v neznámém vzorku jste předem neznali ani přibližně, připravili jste současně dvě ředění vzorku (100x a 10x).

Hodnoty absorbance neznámého vzorku (zkumavky 7 a 8) dosaďte do upravené (finální) rovnice kalibrační přímky a vypočtete koncentraci Fe^{2+} v původním neznámém vzorku. Porovnejte obě vypočtené hodnoty. Pokud se liší, vyberte tu, kterou považujete za správnou, a volbu v závěru zdůvodněte.

Při výpočtu koncentrace nezapomeňte zohlednit ředicí faktor (pokud jste měřili absorbanci v 10× nebo 100× zředěném vzorku, přepočítejte výslednou koncentraci na koncentraci původního vzorku).

Výpočet:

Koncentrace Fe^{2+} ***(vzorek č. ...):*** *(nezapomeňte uvést jednotky)*

3. Porovnejte přístupy vhodné pro určení koncentrace Fe^{2+}

Jako alternativní výpočet koncentrace Fe^{2+} použijte metodu standardního vzorku. Vyberte tu absorbanci standardu, která je nejblíže absorbanci neznámého vzorku a z hodnot absorbance a koncentrace standardu vypočtete koncentraci ve vzorku přímou úměrou.

Vybraný standard:

Výpočet:

Koncentrace Fe^{2+} *(vzorek č. ...):* *(nezapomeňte uvést jednotky)*

Závěr:

Shrňte výsledky vašeho měření, ke zhodnocení vám mohou pomoci následující otázky:

- *Byla vaše kalibrační křivka lineární v celém rozsahu? Odstranili jste nějaký odlehlý bod? Vysvětlete, proč tento bod neleží v lineární části křivky.*
- *Odvoďte z naměřených hodnot absorbance, které ze dvou použitých ředění neznámého vzorku povede pravděpodobněji ke zjištění správného výsledku. Vypočtenou koncentraci ověřte u asistenta a zhodnoťte, zda byl váš prvotní odhad správný. Jaký je rozdíl mezi oběma výsledky? Je velikost rozdílu významná?*
- *Pokud by absorbance neznámého vzorku ležela mimo lineární rozsah kalibrační přímky i po jeho naředění, jaký je správný postup?*
- *Jaké výhody či nevýhody má postup použitý v úkolu č.2 ve srovnání s postupem výpočtu v úkolu č. 3?*

ELEKTROCHEMICKÉ METODY - POTENCIOMETRIE

Datum:

ÚKOLY

1. Nakalibrujte pH-metr
2. Stanovte koncentraci kyseliny octové v běžném octu pomocí potenciometrické titrace

1. Kalibrace pH metru

Provedení: Nejprve se seznámíte pod vedením asistenta s ovládáním pH metru. Potom provedete kalibraci přístroje, která musí měření pH předcházet. Ke kalibraci použijete dva standardní roztoky o známém pH v rozmezí hodnot, které u měřeného vzorku předpokládáte. V našem případě využijete pro kalibraci ftalátový pufr o pH 4,0 (červený roztok) a fosfátový pufr o pH 7 (zelený roztok). Přesný postup, jak kalibraci provést, je uveden v návodu u každého pH-metru.

2. Stanovení koncentrace kyseliny octové v octu potenciometrickou titrací

Provedení:

- Byretu naplňte po rysku roztokem NaOH (titrační činidlo).
- Do kádinky o objemu 50 ml odměřte válečkem **20 ml destilované vody**. Následně přidejte pomocí pipety **1,4 ml octa** a vložte do kádinky míchadlo. Takto jste připravili 15,3x ředěný ocet.
- Kádinku umístěte na míchačku a upravte byretu tak, aby ústí bylo nad kádinkou. Poté ponořte skleněnou elektrodu do roztoku tak, aby frita zajišťující spojení mezi vnitřní a vnější částí elektrody byla ponořená pod hladinou. Následně zapněte míchačku.
- Po ustálení odečtěte hodnotu pH a zapište do tabulky.
- Poté přidejte z byrety 1 ml titračního činidla a výsledné pH po ustálení opět zapište do tabulky. Dále přidávejte z byrety vždy po **1 ml** NaOH až do objemu 19 ml a výsledky zapisujte.
- Následně přidejte z byrety jen po **0,5 ml** NaOH až do objemu 20 ml a výsledky zapisujte.
- Od objemu 20 ml již budete dávkovat roztok NaOH **pipetou po 0,2 ml**. Výsledky a objem zapisujte. Pokračujte, dokud pH nepřekročí 9,0.
- Následně opět použijte k dávkování **byretu** a přidávejte po **0,5 ml** NaOH až do dosažení fáze plató křivky.

Změřené pH:

ml NaOH	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
pH												

ml NaOH	12	13	14	15	16	17	18	19	19,5	20	20,2	20,4
pH												

ml NaOH	20,6	20,8	21	21,2	21,4	21,6	21,8					
pH												

ml NaOH												
pH												

- Z naměřených hodnot sestrojte graf závislosti pH (osa-y) na množství přidaného titračního činidla NaOH (osa-x). V grafu vyznačte bod ekvivalence. Postup, jak najít bod ekvivalence najdete v teoretickém úvodu.

Graf (foto):

- Na základě zjištěného objemu titračního činidla, potřebného k dosažení bodu ekvivalence, vypočítejte molární koncentraci kyseliny octové. Tuto molární koncentraci následně přepočítejte na hmotnostní koncentraci (g.100 ml^{-1}) tak, jak bývá uvedeno na etiketě. Molární hmotnost kyseliny octové: 60,052 $g.mol^{-1}$.

Výpočet a výsledky:

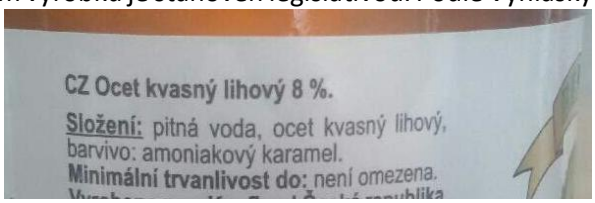
Bod ekvivalence – spotřeba NaOH (ml):	
Koncentrace kys. octové (mol. l^{-1}):	
Koncentrace kys. octové (g.100 ml^{-1}):	

Pro přemýšlivé:

Je údaj o ředění octa před titrací při našem výpočtu důležitý, nebo jste se obešli i bez něj?

Dala by se vypočítat koncentrace kyseliny octové v octu přímo z naměřených hodnot pH?

Kvasný ocet lihový je tradiční potravinářský výrobek, který vzniká biologickým dvoustupňovým procesem. Nejprve kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) přeměňují sacharidy na ethanol. Pro výrobu ethanolu (kvasného lihu) se v českých podmínkách tradičně používají především obilí (pšenice, žito, kukuřice) obsahující škrob, a také melasa z cukrové řepy, která obsahuje zbytky sacharózy, glukózy a fruktózy. Následně bakterie (*Acetobacter*, *Gluconobacter*) tento ethanol za přístupu kyslíku oxidují na kyselinu octovou. Výsledkem je vodný roztok kyseliny octové, který se běžně používá k ochucování a konzervaci potravin. Obsah kyseliny octové v hotovém výrobku je stanoven legislativou. Podle Vyhlášky č. 248/2018 Sb. musí být na obalu uvedena kyselost octa v procentech (% m/V) a skutečný obsah se může lišit od deklarované hodnoty směrem dolů nejvýše o 0,2 %. Nejběžněji se prodává kvasný lihový ocet označený jako 8 %.



Závěr:

Shrňte výsledky vašeho měření do souvislého odstavce. Ke zhodnocení vám mohou pomoci následující otázky:

- *Co je vlastně pH? Na jakém principu pracuje používaný pH-metr?*
- *Jaký je vzorec kyseliny octové? Je to silná nebo slabá kyselina? Proč? Co se děje, když do ní postupně přidáváte NaOH?*
- *Splnil vzorek octa legislativní požadavky?*
- *Zhodnoťte a vysvětlete, v čem by mohla spočívat odchylka mezi Vámi stanovenou hodnotou a hodnotou uvedenou výrobcem octa na etiketě.*

Pro přemýšlivé: Přidání prvních 2 ml NaOH vyvolá větší vzestup pH, než přidání dalších 15 ml; po počátečním strmějším vzrůstu křivka stoupá jen mírně. Proč? Co se v titrační kádince děje? Jaké tam jsou v této fázi látky?

OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKŮ LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ

Datum:

ÚKOLY

1. Otestujte experimentálně vlastní preciznost pipetování při přípravě roztoků ředěním
2. Zhodnoťte preciznost (precision) a pravdivost (trueness) vaší práce; porozumění chybám

1. Test vlastní preciznosti pipetování při přípravě roztoků ředěním

Připravte si mikrotitrační destičku, zásobní roztoky $KMnO_4$, R1= 0,04 mol.l^{-1} a R2= 0,004 mol.l^{-1}, pipety a vhodné špičky (žlutá pipeta 2-20 µL, žlutá pipeta 20-200 µL, modrá pipeta 200-1000 µL).

Každý student v podskupině napipetuje roztoky dle tabulky do dvou sloupců – modrého a žlutého (sloupce 1 a 2 *nebo* 3 a 4 *nebo* 5 a 6), pipetování do sloupců zelených (9-12) provede **jeden** ze studentů v podskupině.

a) Preciznost pipetování malých objemů (modré sloupce)

Do prvního sloupce v destičce (jamky A-H) napipetujte **158 µL destilované vody** a přidejte **2,0 µL R1** (0,04 mol.l^{-1} $KMnO_4$), vzorky promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním (špičku poté vyhoďte).

b) Preciznost pipetování (žluté sloupce)

Do druhého sloupce v destičce (jamky A-H) napipetujte **140 µL destilované vody** a přidejte **20 µL R2** (0,004 mol.l^{-1} $KMnO_4$), vzorky promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním (špičku poté vyhoďte).

c) Preciznost sériového ředění (zelené sloupce)

- Do sloupců 9 -12 (jamky A-H) napipetujte **80 µL destilované vody** (špičku poté vyhoďte)
- Do sloupce 9 (jamky A-H) napipetujte **80 µL R2** (0,004 mol.l^{-1} $KMnO_4$), vzorky promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním
- Přepipetujte **80 µL** roztoku z jamky A9 (**R9**) → do jamky A10, stejně postupujte v jamkách B9, C9 až H9, vzorky opět promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním
- Přepipetujte **80 µL** roztoku z jamky A10 (**R10**) → A11, stejně postupujte v jamkách B10, C10 až H10 vzorky opět promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním

Destilovaná voda ve sloupci č.12 bude sloužit jako blank (slepý vzorek).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Student č.1		Student č.2		Student č.3							
A	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2			80µl R2	80µl R9	80µl R10	voda
B	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2			80µl R2	80µl R9	80µl R10	voda
C	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2			80µl R2	80µl R9	80µl R10	voda
D	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2			80µl R2	80µl R9	80µl R10	voda
E	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2			80µl R2	80µl R9	80µl R10	voda
F	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2			80µl R2	80µl R9	80µl R10	voda
G	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2			80µl R2	80µl R9	80µl R10	voda
H	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2	2 µl R1	20µl R2			80µl R2	80µl R9	80µl R10	voda

- Změřte absorbanci všech vzorků v destičce při vlnové délce 520 nm. Do tabulky vepište hodnoty absorbance u metody a), b) a pro metodu c) opište hodnoty ze sloupce 11.

2. Zhodnocení preciznosti (precision) a pravdivosti (trueness) vaší práce

- Ve vzorcích připravených metodou a), metodou b) a metodou c), spočítejte: průměr, směrodatnou odchylku (SD versus SEM) a variační koeficient (VC).
- Vypočítejte teoretickou koncentraci $KMnO_4$ v měřených vzorcích (c_{teor}).
- Pomocí přiložené kalibrační křivky stanovte experimentálně zjištěnou koncentraci (c) $KMnO_4$. Do rovnice přímky kalibrace dosaďte průměrnou absorbanci a vypočtěte koncentraci.
- Vypočtěte relativní chybu (bias) vůči teoretické hodnotě:

$$\text{bias}\ (\%) = \frac{\bar{c} - c_{\text{teor}}}{c_{\text{teor}}} \times 100$$

Výsledky a výpočty:

	Absorbance						
	Metoda a)			Metoda b)			Metoda c) (pouze sloupec 11)
	Student č. 1	Student č. 2	Student č. 3	Student č. 1	Student č. 2	Student č. 3	
A							
B							
C							
D							
E							
F							
G							
H							
Průměr							
SEM							
SD							
VC							
c $KMnO_4$ (změřená)							
c $KMnO_4$ (teoretická)							
Bias							

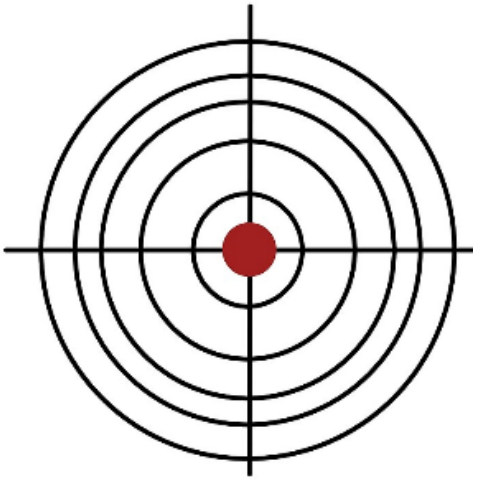
Závěr:

Pro účely tohoto cvičení je za hlavní potenciální zdroj variability výsledků považována nepřesnost pipetování. Použitá spektrofotometrická metoda byla validována a vykazuje vyhovující pravdivost, preciznost a robustnost; ostatní zdroje analytické variability jsou proto v rámci tohoto hodnocení považovány za zanedbatelné.

Shrňte výsledky vašeho měření, ke zhodnocení dat vám mohou pomoci následující otázky.

- *Popište rozdíly mezi výsledky jednotlivých studentů. Diskutujte možné zdroje chyb, které jste zaznamenali a navrhněte opatření, jak se jim vyvarovat.*
- *Jaký typ chyb se odráží ve VC? Jaký typ chyb se odráží v hodnotě bias? Jak se liší směrodatná odchylka (SD) a bias?*
- *Na základě bias a VC rozhodněte, která z metod přípravy roztoku je ve vašich rukou nejpreciznější a která nejpravdivější.*
- *Pro každou metodu stanovení koncentrace $KMnO_4$ uveďte, jakou chybou může být zatížená, jak ji odhalíte a navrhněte, jak chybu odstranit.*

Jak byste zhodnotili svoji práci? Umístěte výsledky vašeho měření metod a) b) a c) do terče 😊. Zakreslete průměr a SD.



SPECIFIČNOST ENZYMOVÉ ÚČINNOSTI A VLIV PROSTŘEDÍ

Datum:

ÚKOLY

1. Stanovte pH optimum pro β-fruktofuranozidázu
2. Posuďte vliv teploty na katalytickou aktivitu β-fruktofuranozidázy
3. Posuďte vliv koncentrace β-fruktofuranozidázy na její katalytickou aktivitu
4. Určete specifičnost β-fruktofuranozidázy

Princip:

Vašim úkolem bude pozorovat a ovlivňovat enzymově katalyzovanou chemickou reakci, kde sacharáza štěpí sacharózu. Substrátem je tedy disacharid sacharóza (c = 0,029 mol.l^{-1}). Enzymem je β-fruktofuranozidáza (invertáza, sacharáza); byla získána z kvasnic (enzymový preparát byl připraven rozmělněním 0,5 g kvasnic ve 200 ml destilované vody). Je-li enzym aktivní, rozštěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Po přidání Fehlingova činidla a povaření glukóza redukuje modrou komplexní měďnatou sloučeninu $CuSO_4$ na cihlově červený Cu_2O.

Droždí (pekařská a pivovarská kvasinka) obsahuje Saccharomyces cerevisiae. S. cerevisiae se běžně vyskytuje v potravinách; může být občas i součástí lidské. Je široce využívaná jako modelový organismus v molekulární biologii. S. cerevisiae podmíněný patogen: může způsobovat infekce imunokompromitovaných jedinců.

1. Stanovení optimálního pH pro β-fruktofuranozidázu

Provedení:

- Do tří označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou pufry, sacharózu a enzymový preparát. Enzymový preparát je nutné před každým použitím důkladně protřepat.
- Zkumavky protřepejte a umístěte do vodní lázně (37 °C) v přední části laboratoře 
- Mezitím si v kádince připravte zásobní roztok Fehlingova činidla. Pro všechny úkoly budete potřebovat přibližně 30 ml Fehlingova činidla, které připravíte smícháním roztoků Fehling I a Fehling II. Roztoky Fehling I a Fehling II smísíte v poměru 1:1 (15 ml + 15 ml). Použijte váleček.
- Zapalte kahan a připravte si vroucí vodní lázeň.
- Po skončené inkubaci přidejte válečkem Fehlingovo činidlo a povařte ve vroucí vodní lázni.
- Do tabulky zaznamenejte zabarvení roztoků a určete, které pH je pro β-fruktofuranozidázu optimální.

	1.	**2.**	**3.**
citrát-fosfátový pufr pH	1 ml pH 4.0	1 ml pH 7.0	1 ml pH 8.0
sacharóza	2 ml	2 ml	2 ml
enzymový preparát	1 ml	1 ml	1 ml
Promíchejte a inkubujte při 37 °C ve vodní lázni 15 min. 			
Fehlingovo činidlo	2 ml	2 ml	2 ml
Promíchejte a povařte ve vroucí vodní lázni (kahan).			
zabarvení			

Pozorování: *Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu. Na základě vašich výsledků vysvětlete vliv pH na enzymově katalyzovanou reakci.*

Při měření pH optim byste zjistili, že při extrémně kyselém pH (pH=1) není enzym aktivní — jak ověříte, zda je enzym denaturován nebo jen dočasně inaktivován?

2. Vliv teploty

Provedení:

- Do čtyř označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou pufr s optimálním pH a sacharózu.
- Zkumavky protřepejte a necháte inkubovat po dobu 5 minut při uvedených teplotách (ledová lázeň, stojánek při laboratorní teplotě, vodní lázeň temperovaná na 37 °C). Obsah poslední zkumavky povaříte ve vroucí vodní lázni.
- Potom do všech zkumavek přidáte dávkovací pipetou po 1 ml enzymového preparátu, protřepejte a umístíte opět při uvedených teplotách.
- Po skončené inkubaci přidáte válečkem Fehlingovo činidlo a povaříte ve vodní lázni.
- Do tabulky zaznamenejte zabarvení roztoků a popište účinnost enzymu při testovaných teplotách.

	1.	**2.**	**3.**	**4.**
citrát-fosfátový pufr	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
sacharóza	2 ml	2 ml	2 ml	2
teplota	ledová lázeň	teplota laboratoře	37 °C	vroucí vodní lázeň
Promíchejte a inkubujte při odpovídající teplotě/podmínkách výše 5 min.				
enzymový preparát	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Promíchejte a inkubujte při odpovídající teplotě 15 min.				
Fehlingovo činidlo	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Promíchejte a povařte ve vroucí vodní lázni (kahan).				
zabarvení				

Pozorování: *Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu. Která z teplot způsobí nevratné změny ve struktuře enzymu?*

3. Vliv koncentrace enzymu

Provedení:

- Do čtyř označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou pufr, sacharózu, enzymový preparát a destilovanou vodu, protřepejte a umístíte do vodní lázně.
- Po skončené inkubaci přidáte válečkem Fehlingovo činidlo a povaříte ve vodní lázni.
- Do tabulky zaznamenejte zabarvení roztoků a popište, jak se projevila změna koncentrace enzymu na jeho aktivitě.

	1.	**2.**	**3.**	**4.**
citrát-fosfátový pufr	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
sacharóza	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
enzymový preparát	1 ml	0,5 ml	0,1 ml	-
destilovaná voda	-	0,5 ml	0,9 ml	1 ml
Promíchejte a inkubujte při 37 °C ve vodní lázni 15 min.				
Fehlingovo činidlo	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Promíchejte a povařte ve vroucí vodní lázni (kahan).				
zabarvení				

Pozorování: *Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu***.**

4. Určení enzymové specifičnosti

Provedení:

- Do tří označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou citrát-fosfátový pufr s optimálním pH
    - napipetujete substráty (sacharóza, škrob, nebo želatina)
    - přidáte enzymový preparát, protřepete a umístíte do vodní lázně s teplotou 37 °C.
- Po skončené inkubaci přidáte kapátkem Fehlingovo činidlo a povaříte ve vroucí vodní lázni.
- Do tabulky zaznamenejte zabarvení roztoků a určete specifický/é substrát/y.

	1.	**2.**	**3.**
citrát-fosfátový pufr	1 ml	1 ml	1 ml
sacharóza	2 ml	-	-
škrob	-	2 ml	-
želatina	-	-	2 ml
enzymový preparát	1 ml	1 ml	1 ml
Promíchejte a inkubujte při 37 °C ve vodní lázni 15 min. 			
Fehlingovo činidlo	2 ml	2 ml	2 ml
Promíchejte a povařte ve vroucí vodní lázni (kahan).			
zabarvení			

Pozorování: *Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu. Co je substrátová specificita enzymu (jak a proč enzym váže jen určité molekuly). Jaký je chemický rozdíl mezi sacharózou a škrobem? Proč sacharáza rozštěpí sacharózu, ale ne škrob?*

Závěr: **Znázorněte strukturu substrátu a produktů enzymové reakce a vysvětlete princip jejich detekce.** Nejprve si dobře promyslete struktury substrátu a produktů enzymové reakce. Vzorce zakreslete. Vysvětlete princip barevné změny z modré na cihlově červenou při detekci produktu rozkladu sacharózy.

D-glukóza – lineární vzorec

α-D-glukopyranóza cyklický vzorec -zakroužkujte poloacetálový hydroxyl

β-D-fruktofuranóza – cyklický vzorec zakroužkujte poloacetálový hydroxyl

D-fruktóza – lineární vzorec

sacharóza

Co jste se dozvěděli z pokusů o enzymu – sacharáze *S. cerevisiae***?**

Při kterém pH pracuje nejlépe? Při jaké teplotě pracuje nejlépe? S jakým substrátem?

Problémy k řešení:

1) Jak je to se sacharázou u lidí?

V lidském organismu se oligosacharidy štěpí v tenkém střevě, konkrétně v duodenu a jejunu. Štěpení probíhá na membráně enterocytů, kde je lokalizovaný komplex sacharáza-isomaltáza. Sacharáza katalyzuje hydrolýzu sacharózy na glukózu + fruktózu. Isomaltázová složka komplexu štěpí převážně α-1,6 vazby (větvené části škrobu — amylopektinu).

- *Porovnejte pH optimum lidské a mikrobiální sacharázy. Porovnejte pH s hodnotami pH v žaludku, duodenu, tenkém střevě, tlustém střevě).*

2) Jak udržíme při životě buňky v buněčné laboratoři?

Při in-vitro kultivaci buněk používáme médium s upraveným pH přizpůsobeným typu buněk. Pro běžné savčí buňky se médium upravuje na pH ≈ 7,2–7,4

- *Co musí médium pro kultivaci obsahovat, aby se tlumily výkyvy pH?*
- *Porovnejte pH v extracelulárním a intracelulárním prostoru a v lysozomech.*

3) Jakto, že funguje PCR?

Při PCR (polymerázová řetězová reakce) se používá enzym, který staví z nukleotidů nové vlákno DNA. PCR probíhá jako opakovaný cyklus tří hlavních kroků:

- *Denaturace — dvojvláknová DNA se zahřeje (obvykle ~95 °C), čímž se přeruší vodíkové vazby mezi bázemi a dvojitá šroubovice se rozvine na jednovláknovou DNA.*
- *Annealing (připojení primerů) — teplota se sníží (typicky 50–65 °C), což umožní komplementárním oligonukleotidovým primerům připojit se (hybridizovat) k cílovým sekvencím na jednovláknové DNA.*
- *Elongace (prodloužení) — při optimální teplotě (elongace při PCR probíhá obvykle při 72 °C), enzym rozpozná 3' konec primeru a katalyzuje začleňování dNTP (nukleotidů), čímž syntetizuje nové komplementární vlákno.*

- *Identifikujte enzym používaný v PCR. Jaké vlastnosti musí mít, aby v podmínkách PCR zůstal funkční? Jaký konkrétní enzym se proto v PCR používá? Vysvětlete také pojmy „termolabilita", „termostabilita" a „denaturace" a uveďte, proč jsou tyto vlastnosti klíčové pro úspěch PCR. Dala by se metoda provést i za použití běžné eukaryotické (např. lidské) polymerázy?*

KONEC. Na shledanou v Biochemii II.