



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

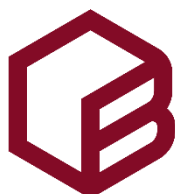


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Projekt pt.: „STUDENCI HIPOKRATESA - kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej” w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, nr umowy: FERS.01.05-IP.08-0335/23-00

INSTRUKCJE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII

*dla kierunku lekarskiego
Politechniki Bydgoskiej
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich*



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

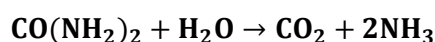
Dofinansowane przez
Unię Europejską



ĆWICZENIE 7.

Czynniki warunkujące aktywność enzymów na przykładzie ureazy

Ureaza (EC 3.5.1.5) katalizuje reakcję hydrolizy mocznika:



Enzym ten występuje w dużych stężeniach w nasionach niektórych roślin, np. soi. Wykazuje on bardzo wysoką specyficzność substratową, a do niedawna przypisywano mu nawet specyficzność absolutną względem mocznika. Optimum temperatury dla ureazy wynosi 40°C, a optimum pH 7,0.

W badaniu szybkości hydrolizy mocznika pod wpływem ureazy oznacza się ilość produktu reakcji – amoniaku – metodą spektrofotometryczną. Amoniak z odczynnikiem Nesslera (silnie alkaliczny roztwór jodku rtęci w jodku potasu) daje barwny kompleks o natężeniu barwy proporcjonalnym do stężenia amoniaku w badanej próbce.

Wykonanie

a) Wpływ temperatury. Do trzech probówek odmierzyć po 1 ml roztworu enzymu i po 1 ml 0,1 M. buforu fosforanowego o pH 7,0. Pierwszą probówkę umieścić w temp. 0°C (woda z lodem), drugą w temp. 40°C, a trzecią w temp. 100°C (wrząca łaźnia wodna). Po doprowadzeniu zawartości probówki do odpowiedniej temperatury (przez ok. 3 min.) wyjąć probówkę z wrzącej łaźni wodnej i schłodzić jej zawartość. Odmierzyć do tak przygotowanych probówek po 1 ml roztworu 0,5 M mocznika, wymieszać zawartość probówek, a następnie wstawić do termostatu o temp. 40°C, i inkubować 15 min. Probówka trzecia pozostaje na czas inkubacji w zlewce z lodem. Następnie przerwać reakcję enzymatyczną, dodając do wszystkich probówek po 1 ml 0,5 M HCl, a dalej 5 ml wody i 1 ml odczynnika Nesslera.

Wyniki:



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



b) Wpływ pH. Do trzech probówek odmierzyć po 1 ml roztworu enzymu i po 1 ml buforów: do pierwszej 0,1 M octanowego o pH 4,0, do drugiej 0,1 M fosforanowego o pH 7,0 i do trzeciej 0,1 M boranowego o pH 9,0. Do wszystkich probówek dodać po 1 ml 0,5 M roztworu mocznika, wymieszać i umieścić je w termostacie o temp. 40 °C, inkubować przez 15 min. Następnie przerwać reakcję enzymatyczną, dodając do wszystkich probówek po 1 ml 0,5 M HCl, a dalej 5 ml wody i 1 ml odczynnika Nesslera.

Wyniki:

c) Wpływ inhibitorów i aktywatora. Do 6 probówek odmierzyć po 1 ml roztworu enzymu i po 1 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,0. Następnie dodawać:

Probówka 1: 1 ml 0,001 M HgCl₂

Probówka 2: 1 ml 0,001 M HgCl₂ + 1 ml 0,1M cysteiny

Probówka 3: 1 ml 0,001 M HgCl₂ + 1 ml 0,1M zredukowanego glutationu

Probówka 4: 1 ml 0,01 M Cu SO₄

Probówka 5: 1 ml 0,1 M NaF

Probówka 6: -

Do wszystkich 6 probówek dodać po 1 ml 0,5 M roztworu mocznika. Zawartość probówek wymieszać, umieścić je w termostacie o temp 40°C i inkubować 30 min. Następnie przerwać reakcję enzymatyczną, dodając do wszystkich probówek po 1 ml 0,5 M HCl, a dalej 5 ml wody i 1 ml odczynnika Nesslera.



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Wyniki