



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

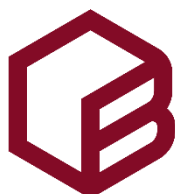


	Nr projektu	FERS.01.05-IP.08-0335/23
	Tytuł projektu	„STUDENCI HIPOKRATESA- kompleksowy program utworzenia i wdrożenia kierunku lekarskiego na Politechnice Bydgoskiej”
	Beneficjent:	Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

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

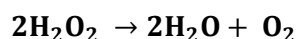
Dofinansowane przez
Unię Europejską



ĆWICZENIE 9.

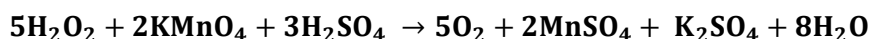
Wykrywanie oksydazy ksantanowej w mleku, wykrywanie katalazy we krwi, wykrywanie peroksydazy, oznaczenie aktywności katalazy, wykrywanie katalazy w różnym materiale biologicznym

Katalaza (EC 1.11.1.6.) pełni funkcję w ochronie komórek oraz działa przeciwutleniająco. Enzym ten należy do pierwszej klasy oksydoreduktaz, katalizuje rozkład nadtlenu wodoru według równania:



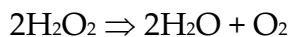
Nadtlenek wodoru (H_2O_2) powstaje w procesie oddychania tlenowego, który służy komórkom do wytwarzania energii z glukozy i tlenu. Nadmiar nadtlenu może mieć jednak szkodliwy wpływ na komórki.

Metoda oznaczania aktywności katalazy polega na manganometrycznym oznaczeniu nie rozłożonego nadmiaru nadtlenu wodoru w reakcji, której przebieg jest następujący:

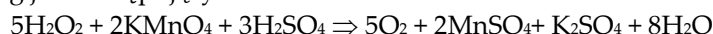


A. Oznaczanie aktywności katalazy z bulw ziemniaka

Katalaza jest enzymem katalizującym rozkład nadtlenu wodoru według równania:



Metoda polega na manganometrycznym oznaczeniu nie rozłożonego nadmiaru nadtlenu wodoru w reakcji, której przebieg jest następujący:



Przygotowanie wyciągu enzymu:

Odważyć 5 g ziemniaka, pokroić i dokładnie utrzeć w moździerzu dodając stopniowo 80 ml CaCO_3 (zawieszinę przed każdym dodaniem odczynnika wymieszać). Roztartą próbkę przesączyć do 100 ml kolby miarowej (przed sączeniem sączonek zwilżyć wodą destylowaną), przesącz uzupełnić do kreski roztworem CaCO_3 . Przesącz ten jest wyciągiem enzymu niezbędnym do dalszych analiz.

Wykonanie próby właściwej i zerowej (kontrolnej)

Do 4 kolbek stożkowych odmierzyć po 20 ml wyciągu enzymu i 20 ml wody destylowanej. W dwóch kolbach należy zinaktywować enzym przez ogrzanie zawartości do wrzenia. Po ostudzeniu do



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



temperatury pokojowej dodać do wszystkich kolbek po 3 ml 1% roztworu H_2O_2 . Zawartość kolbek szybko wymieszać i pozostawić w temperaturze pokojowej na 15 minut. Następnie do każdej kolbki dodać po 5 ml 10% H_2SO_4 zatrzymując tym samym reakcję enzymatyczną. Nie rozłożony H_2O_2 miareczkować w kolbach 0,1 N $KMnO_4$ do lekko różowego zabarwienia utrzymującego się przez około 2 minuty.

Obliczenie aktywności katalazy ziemniaka

$$IK = \frac{(a-b) \times 1,7}{15 \times 5}$$

IK – aktywność katalazy ziemniaka wyrażona w mg rozłożonego H_2O_2 na 1g świeżej masy

a– średnia objętość w ml 0,1N $KMnO_4$ zużytego na miareczkowanie próby kontrolnej

b– średnia objętość w ml 0,1N $KMnO_4$ zużytego na miareczkowanie próby właściwej

1,7 - współczynnik przeliczeniowy dla H_2O_2 (1 ml 0,1N $KMnO_4$ odpowiada 1,7mg H_2O_2)

Wynik:

B. Wykrywanie katalazy we krwi

Zasada metody

Katalaza jest bardzo aktywnym enzymem, w ciągu sekundy jej cząsteczka rozkłada około 200 000 cząsteczek nadtlenku wodoru. Jest aktywna w szerokim zakresie pH (5–10,5). W tkankach ssaków katalaza znajduje się głównie w wątrobie, erytrocytach i w nerkach, nie występuje w surowicy krwi.

Materiał badany:

Krew.

Odczynniki:

3% roztwór H_2O_2 .

Wykonanie

Do dwóch probówek odmierzyć po 2 ml wody destylowanej i dodać po kropli krwi.

Jedną probówkę wstawić na 5 min do wrzącej łaźni wodnej, wyjąć i oziębic, a drugą probówkę pozostawić w temperaturze pokojowej.

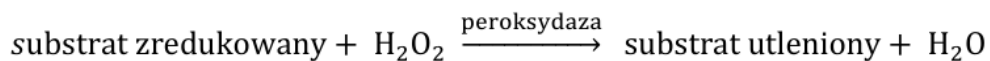
Do obydwu probówek dodać po około 10 kropli 3% roztworu H_2O_2 .

Wyniki

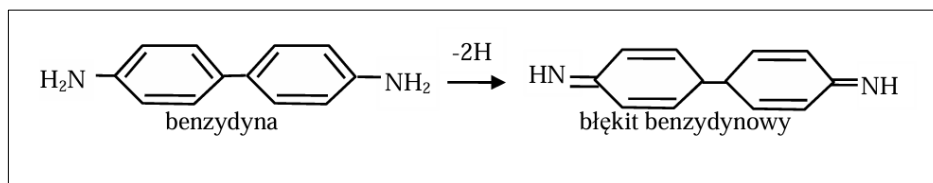


C. Wykrywanie peroksydazy

Peroksydazy to enzymy, które redukują nadtlenek wodoru do wody, utleniając różne związki:



Peroksydazy są powszechne w tkankach roślinnych i mogą katalizować utlenianie wielu metabolitów, np. NADH + H⁺, NADPH + H⁺, tryptofanu, cytochromu c, fenoli, glutationu. Podobnie jak katalaza są hemoproteinami, np. peroksydaza chrzanowa, szeroko wykorzystywana w analityce. Hemoproteinowe peroksydazy występują również w niektórych komórkach zwierzęcych. W celu wykazania obecności peroksydazy w materiale biologicznym można wykorzystać benzydynę, która pod wpływem H₂O₂ w obecności peroksydazy utlenia się do błękitu benzydynowego.



Materiał badany: Sok z ziemniaka (warzywo utrzeć na tarce, odcisnąć i przesączyć. Otrzymany sok zachować do innych analiz)

Odczynniki:

1. 3% roztwór H₂O₂.

2. Pirogalol..

Wykonanie

Do probówki nalać około 1 ml soku z ziemniaka.

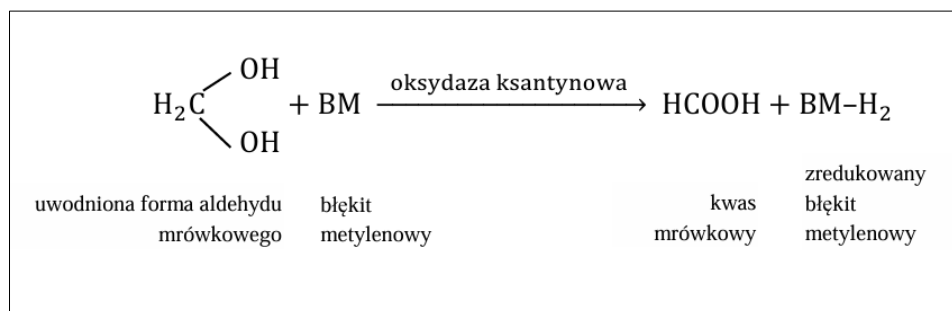
Dodać kilka kropli roztworu pirogalolu i kilka kropli 3% roztworu H₂O₂.

Obserwacja



D. Wykrywanie oksydazy ksantynowej w mleku

Oksydaza ksantynowa (EC 1.2.3.2) odznacza się małą swoistością, katalizuje utlenianie aldehydów alifatycznych i aromatycznych oraz zasad purynowych (łącznie z ksantyną i hipoksantyną) z wytworzeniem kwasu moczowego. Akceptorem wodoru jest tlen cząsteczkowy, który zostaje zredukowany do H_2O_2 lub łatwo redukujący się barwnik, np. błękit metylenowy. Oksydaza ksantynowa jest flawoproteiną, zawiera molibden oraz żelazo.



Odczynniki:

1. 0,02% roztwór błękitu metylenowego.
2. 0,5% roztwór aldehydu mrówkowego.
3. Parafina płynna.

Wykonanie

Do dwóch probówek odmierzyć po 2,5 ml mleka.

Jedną probówkę wstawić na 5 min do wrzącej łaźni wodnej, następnie wyjąć i ochłodzić.

Do obu probówek dodać po 0,5 ml błękitu metylenowego i 0,5 ml 0,5% roztworu aldehydu mrówkowego.

Dokładnie wymieszać.

Nawarstwić kilka kropli płynnej parafiny (zabezpieczenie przed działaniem tlenu z powietrza).

Pozostawić na 30–60 min i porównać obydwie próby.

Wyniki