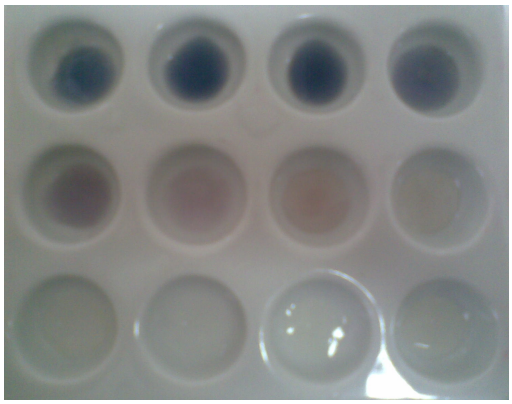
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
KATEDRA BIOCHEMII I FIZJOLOGII ZWIERZĄT
Zakład Biochemii
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12
tel. 081 445 69 73

Wpływ pH, temperatury, aktywatorów na aktywność amylazy ślinowej

Zadanie 1. Oznaczanie punktu achromowego

Celem zadania jest wyznaczenie punktu achromowego (czasu po jakim rozkładowi ulegnie cały substrat, ocenianego na podstawie zmiany barwy z fioletowej na żółtą) reakcji hydrolizy skrobi pod wpływem amylazy ślinowej).



Rys. 1
Przykład oznaczenia punktu chromowego w zadaniu 1.

Widoczna zmiana zabarwienia z fioletowej (pozytywny wynik reakcji skrobi z jodem) do żółtej (barwa wynika z zabarwienia roztworu jodu w KI)

Wykonanie. Przygotować płytkę porcelanową – odmierzyć do wszystkich zagłębień po 3 krople 0,001 mol/dm^3 I_2 w KI i po 1 kropli 2 mol/dm^3 HCl.

Do probówki odmierzyć 5 cm^3 1% roztworu wodnego skrobi, 2 cm^3 1% NaCl, 2 cm^3 0,2 mol/dm^3 buforu fosforanowego o pH 6,6, zawartość zmieszać i probówkę wstawić do łaźni wodnej o temp. 37 C. Po kilku minutach, gdy roztwór osiągnie wymaganą temperaturę, dodać 1 cm^3 śliny (źródło enzymu) rozcieńczonej 100-krotnie wodą destylowaną i pozostawić w łaźni wodnej.

Dokładnie w odstępach 1-minutowych od momentu wprowadzenia śliny pobierać po 2 krople tego roztworu i dodać do zagłębień we wcześniej przygotowanej płytce porcelanowej. Obserwować zabarwienie roztworu i zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego. W razie zbyt krótkiego lub zbyt długiego czasu niezbędnego do odbarwienia roztworu próbę powtórzyć, używając innego rozcieńczenia śliny.

Zadanie 2. Badanie wpływu pH na aktywność amylazy ślinowej.

Celem zadania jest badanie wpływu pH środowiska reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi na aktywność amylazy ślinowej.

Wykonanie. Przygotować płytkę porcelanową – odmierzyć do wszystkich zagłębień po 3 krople 0,001 mol/dm^3 I_2 w KI i po 1 kropli 2 mol/dm^3 HCl.

Przygotować 3 oznaczone (1,2,3) probówki. Do każdej odmierzyć po 5 cm^3 1% roztworu skrobi i 2 cm^3 1% NaCl. Potem do probówki 1 dodać 2 cm^3 0,2 mol/dm^3 buforu fosforanowego o pH 6,6, do probówki 2 – 2 cm^3 0,2 mol/dm^3 buforu fosforanowego o pH 8,0 oraz do probówki 3 – 2 ml 0,2 mol/dm^3 buforu fosforanowego o pH 5,0. Wstawić je do łaźni wodnej o temp. 37°C i po kilku minutach do wszystkich probówek dodać po 1 cm^3 śliny odpowiednio rozcieńczonej (wynik zadania 1).

Dokładnie co 1 min z każdej probówki pobierać po 2 krople roztworu i dodawać do poszczególnych zagłębień wcześniej przygotowanej płytki, tak ażeby uzyskać 3 rzędy z 3 różnymi wartościami pH na płytce. Obserwować zmiany zabarwienia roztworu i zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego w poszczególnych wartościach pH.

Zadanie 3. Badanie wpływu jonów chlorkowych na aktywność amylazy ślinowej.

Celem zadania jest badanie wpływu obecności jonów chlorkowych na aktywność amylazy ślinowej.

Wykonanie. Przygotować płytkę porcelanową – odmierzyć do wszystkich zagłębień po 3 krople 0,001 mol/dm^3 I_2 w KI i po 1 kropli 2 mol/dm^3 HCl.

Przygotować dwie oznaczone (1,2) probówki. Do każdej odmierzyć po 5 cm^3 1% roztworu wodnego skrobi i 2 cm^3 0,2 mol/dm^3 buforu fosforanowego o optymalnym pH (wynik z doświadczenia poprzedniego). Potem do probówki 1 dodać 2 cm^3 1% NaCl, a do probówki 2 – 2 cm^3 wody destylowanej i wstawić do łaźni wodnej o temp. 37 C. Po kilku minutach dodać do obu probówek po 1 cm^3 śliny odpowiednio rozcieńczonej (wynik zadania 1).

Dokładnie co 1 min z każdej probówki pobierać po 2 krople roztworu i dodawać do poszczególnych zagłębień wcześniej przygotowanej płytki, tak ażeby uzyskać 2 rzędy z 2 różnymi roztworami na płytce. Obserwować zmiany zabarwienia roztworu i zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego w poszczególnych roztworach.

Zadanie 4. Badanie wpływu temperatury inkubacji na aktywność amylazy ślinowej.

Celem zadania jest badanie wpływu temperatury na aktywność amylazy ślinowej.

Wykonanie. Przygotować płytkę porcelanową poprzez odmierzenie do wszystkich zagłębień po 3 krople 0,001 mol/dm^3 I_2 w KI i po 1 kropli 2 mol/dm^3 HCl.

Przygotować 3 oznaczone (1,2,3) probówki. Do każdej odmierzyć po 5 cm^3 1% roztworu skrobi, 2 cm^3 1% NaCl i 2 cm^3 0,2 mol/dm^3 buforu fosforanowego o optymalnym pH (wynik z zadania 2). Probówkę 1 umieścić w łaźni wodnej o temp. 37 C, probówkę 2 pozostawić w temp. pokojowej, a probówkę 3 umieścić w lodzie. Po kilku minutach dodać do każdej probówki po 1 cm^3 roztworu śliny odpowiednio rozcieńczonej (wynik zadania 1).

Dokładnie co 1 min z każdej probówki pobierać po 2 krople roztworu i dodawać do poszczególnych zagłębień wcześniej przygotowanej płytki, tak ażeby uzyskać 3 rzędy z 3 różnymi wartościami temperatury na płytce. Obserwować zmiany zabarwienia roztworu i zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego w poszczególnych wartościach temperatury.