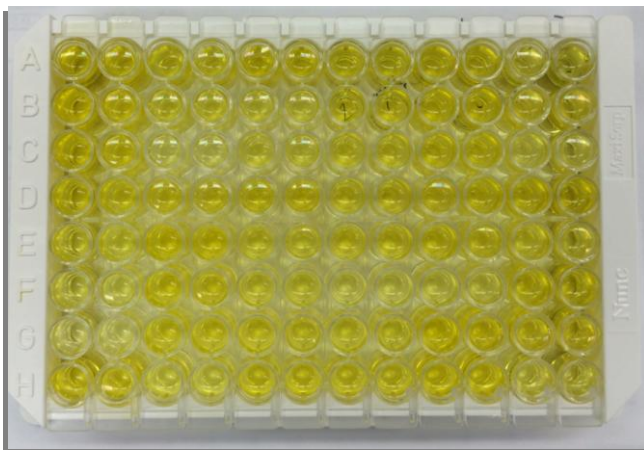


Wpływ pH, temperatury, aktywatorów na aktywność amylazy ślinowej

Zadanie 1. Oznaczanie punktu achromowego.

Celem zadania jest wyznaczenie aktywności amylazy ślinowej.

W pierwszym etapie należy dobrać odpowiednie rozcieńczenie śliny, umożliwiające osiągnięcie punktu chromowego w czasie pomiędzy 3 a 15 min. Punkt achromowy definiujemy jako czas niezbędny do powstania produktów rozkładu skrobi (amylolizy) nie dających barwnej reakcji z jodem.



Wykonanie. Do dołków na płytce 96-dołkowej nakropić po 3 krople $0,001 \text{ mol/dm}^3$ I_2 w KI i po 1 kropli 2 mol/dm^3 HCl (przygotować 15 dołków).

Do probówki odmierzyć 5 cm^3 1% skrobi, 2 cm^3 1% NaCl 2 cm^3 $0,2 \text{ mol/dm}^3$ buforu fosforanowego o pH 6,6, zawartość zmieszać i probówkę wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C .

Po 5 minutach dodać 1 cm^3 śliny (źródło enzymu) rozcieńczonej 100x (rozcieńczenie uzgodnij z prowadzącym ćwiczenia) wodą destylowaną. Zawartość mieszaniny przez cały czas trwania reakcji trzymaj w łaźni wodnej (37°C). Moment zmieszania enzymu z substratem rozpoczyna reakcję enzymatyczną (czas „0”).

Dokładnie w odstępach 1-minutowych pobierać po $0,2 \text{ cm}^3$ inkubatu do dołków w płytce. Obserwować zabarwienie roztworu i zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego.



Przykładowy punkt achromowy: 8 min.



W razie zbyt krótkiego czasu (mniej niż 3 minuty) lub zbyt długiego czasu (więcej niż 15 minut) niezbędnego do odbarwienia roztworu próbę powtórzyć używając innego rozcieńczenia śliny. Ustalone na tym etapie rozcieńczenie zostanie wykorzystane do kolejnych zadań.

Zadanie 2. Badanie wpływu pH na aktywność amylazy ślinowej.

Celem zadania jest badanie wpływu pH na aktywność amylazy ślinowej.

Wykonanie. Do dołków na płytce 96-dołkowej nakropić po 3 krople $0,001 \text{ mol/dm}^3$ I_2 w KI i po 1 kropli 2 mol/dm^3 HCl (przygotować w trzech rzędach, osobnych dla każdego pH).

Przygotować 3 probówki oznaczone (1,2,3). Do każdej odmierzyć po 5 cm^3 1% roztworu skrobi i 2 cm^3 1% NaCl.

Następnie do probówek dodać:

- do probówki 1: 2 cm^3 $0,2 \text{ mol/dm}^3$ buforu fosforanowego o pH 6,6
- do probówki 2: 2 cm^3 $0,2 \text{ mol/dm}^3$ buforu fosforanowego o pH 8,0
- do probówki 3: 2 cm^3 $0,2 \text{ mol/dm}^3$ buforu fosforanowego o pH 5,0

Probówki wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C i po 5 minutach do wszystkich 3 próbek dodać 1 cm^3 rozcieńczonej śliny (źródło enzymu). Dokładnie co 1 minutę z każdej probówki pobierać po 2 krople inkubatu do zagłębień wcześniej przygotowanej płytki, tak aby uzyskać trzy rzędy z trzema różnymi wartościami pH.

Obserwować zmiany zabarwienia i zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego dla poszczególnych wartości pH.

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

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

Wykonanie. Do dołków na płytce 96-dołkowej nakropić po 3 krople $0,001 \text{ mol/dm}^3$ I_2 w KI i po 1 kropli 2 mol/dm^3 HCl (przygotować w dwóch rzędach, osobnych dla inkubatu 1 i 2).



Przygotować 2 próbówki oznaczone (1,2). Do każdej odmierzyć po 5 cm³ 1% roztworu skrobi i 2 cm³ 0,2 mol/dm³ buforu fosforanowego o optymalnym pH (wynik z doświadczenia poprzedniego).

Następnie do próbówek dodać:

- do próbówki 1: 2cm³ 1% NaCl
- do próbówki 2: 2cm³ wody destylowanej

Obie próbówki wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 5 minut. Dodać 1 cm³ rozcieńczonej śliny (źródło enzymu).

Dokładnie co 1 minutę z każdej próbówki pobierać po 2 krople inkubatu do poszczególnych dołków wcześniej przygotowanej płytki, tak aby uzyskać dwa rzędy z dwoma różnymi roztworami.

Obserwować zmiany zabarwienia i zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego dla obu próbówek.

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

Celem zadania jest badanie wpływu temperatury na aktywność amylazy ślinowej.

Wykonanie. Do dołków na płytce 96-dołkowej nakropić po 3 krople 0,001 mol/dm³ I₂ w KI i po 1 kropli 2 mol/dm³ HCl (przygotować w trzech rzędach, osobnych dla każdej temperatury).

Przygotować 3 próbówki oznaczone (1,2,3). Do każdej odmierzyć po 5 cm³ 1% roztworu skrobi, 2 cm³ 1% NaCl i 2 cm³ 0,2 mol/dm³ buforu fosforanowego o optymalnym pH (wynik z zadania 2).

- próbówkę 1 umieścić w łaźni wodnej o temp. 37° C
- próbówkę 2 pozostawić w temp. pokojowej
- próbówkę 3 umieścić w lodzie

Po 5 minutach dodać do każdej próbówki po 1 cm³ roztworu rozcieńczonej śliny.

Dokładnie co 1 min z każdej próbówki pobierać po 2 krople inkubatu do dołków wcześniej przygotowanej płytki.

Obserwować zmiany zabarwienia i zanotować czas osiągnięcia punktu achromowego dla poszczególnych wartości temperatury.

