

Enzymy

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství



2025/2026

Obsah

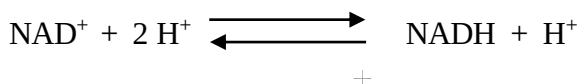
ÚLOHA 1 – STANOVENÍ KATALYTICKÉ AKTIVITY LAKTÁTDEHYDROGENASY V SÉRU WARBURGOVÝM OPTICKÝM TESTEM	3
ÚLOHA 2 – DŮKAZ SPECIFIČNOSTI ENZYMŮ.....	7
ÚLOHA 3 – VLIV PH NA AKTIVITU ENZYMU.....	9
ÚLOHA 4 – OXIDOREDUKTÁZY.....	10

Úloha 1 – Stanovení katalytické aktivity laktátdehydrogenasy v séru Warburgovým optickým testem

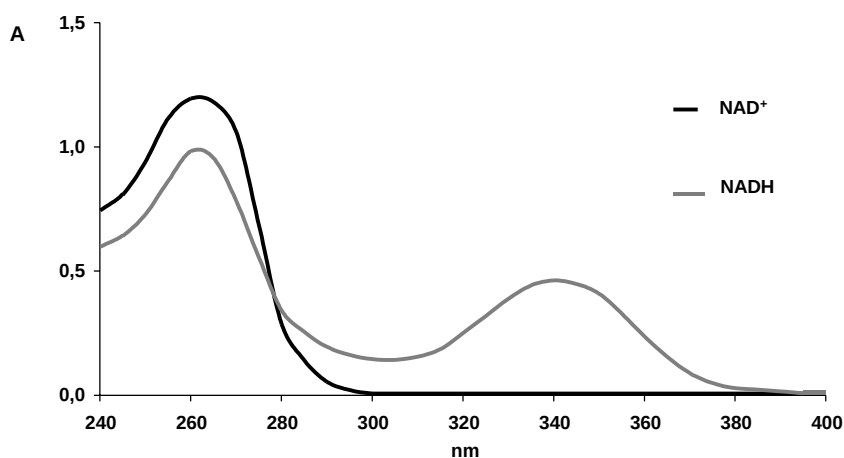
Princip:

Nikotinamidadenindinukleotid, popř. nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NAD, NADP) jsou koenzymy různých oxidoredukčních enzymů. NAD (NADP) jako důležitý přenašeč redukčních ekvivalentů existuje v oxidované a redukované formě jako NAD^+ a $\text{NAD}^+ + \text{H}^+$, které se liší svými absorpčními vlastnostmi v UV oblasti. Redukovaná forma vykazuje charakteristický absorpční vrchol s maximem při 340 nm na rozdíl od formy oxidované, která při této vlnové délce neabsorbuje.

Warburgův optický test využívá odlišných absorpčních vlastností oxidované a redukované formy nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$). Oxidovaná forma NAD^+ je charakterizovaná jedním absorpčním maximem při 260 nm. Redukce, při níž se ztrácí aromatický charakter pyridinu v NAD^+ a je nahrazen chinoidním uspořádáním, je doprovázena vznikem dalšího maxima při 340 nm.



Absorpční spektrum NAD^+ a NADH

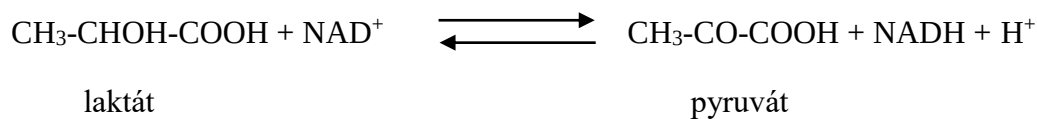


Sledováním úbytku absorbance (při oxidaci $\text{NADH} + \text{H}^+$ na NAD^+) nebo naopak přírůstku absorbance (při redukci NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$) při 340 nm za časovou jednotku ($\Delta A / \Delta t$, obvykle za 3 minuty) lze měřit rychlost enzymových reakcí, jejichž koenzymem je nikotinamidadenindinukleotid. Platí, že změna absorbance je přímo úměrná počtu přeměněných molekul koenzymu a že přeměna jednoho molu koenzymu odpovídá přeměně jednoho molu substrátu.

Warburgův optický test slouží např. pro stanovení aktivity enzymů, které vyžadují NAD pro svoji reakci, nebo substrátů, které mohou být přeměněny oxidoredukčními enzymy s NAD (NADP) jako koenzymy.

Jako příklad využití Warburgova optického testu v našem cvičení bude stanovení aktivity enzymu laktátdehydrogenasy (LD, EC 1.1.1.27).

Můžeme připravit reakční směs z enzymu laktátdehydrogenasy, koenzymu (NAD^+) a příslušného substrátu (laktátu) a za optimálních podmínek zjišťovat reakční rychlost měřením změn absorpce NADH při vlnové délce 340 nm.



Aktivita enzymu se projeví v kyvetě spektrofotometru s UV-zdrojem, která obsahuje reakční směs s enzymem, substrátem a NAD^+ , plynulým vzestupem absorpce při 340 nm.

Při znalosti molárního absorpčního koeficientu NADH při této vlnové délce a přepočtu na ředění a časový interval jedné sekundy je možné vyjádřit aktivitu LD v séru v $\mu\text{kat/l}$. Není-li k dispozici kontinuální měření absorpce v čase, je možné provádět měření v kyvetě s reakční směsí diskontinuálně, např. měřením poklesu absorpce při 340 nm v intervalech po 1 minutě ($\Delta A_{340 \text{ nm}}$), a přepočíst na interval 1 s.

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Lactatedehydrogenase-l Bio-La-Test od firmy Erba-Lachema s.r.o.

- | | | | |
|---------------|--------------------------|-------------|--|
| 1. Činidlo 1: | N-Methyl D-glukamin | 406 mmol/l |  |
| 2. Činidlo 2: | N-Methyl D-glukamin | 406 mmol/l |  |
| | L-laktát | 62,5 mmol/l | |
| 3. Činidlo 3: | NAD^+ 50 mmol/l | |  |
| 4. Sérum | | | |

Postup:

1. Kyvety a roztoky jsou vytemperovány na 37 °C
2. Do kyvety připravte slepý vzorek:
800 µl činidla 2 (pufr a L-laktát)
200 µl činidla 1 (pufr)
20 µl séra
3. Promíchejte.
4. Podle pracovního návodu pro spektrofotometr Lightwave II+ nastavte měření A při vlnové délce 340 nm (Lightwave II+ - zjednodušený návod).
5. Vynulujte spektrofotometr na slepý vzorek.
6. Do druhé kyvety napipetujte:
800 µl činidla 2 (pufr a L-laktát)
200 µl činidlo 3 (NAD⁺)
20 µl séra
7. Dobře promíchejte a přesně za 1 minutu změřte A pro vlnovou délku 340 nm a запиšte do tabulky.
8. Měření opakujte ještě 5× v přesně jednodominutových intervalech, absorbance запиšte do tabulky v protokolu.
9. Z naměřených hodnot absorbance A₃₄₀ vypočítejte rozdíly absorbance za minutu (ΔA₃₄₀) a z rozdílů absorbance určete průměrnou hodnotu. Získanou průměrnou hodnotu ΔA₃₄₀ použijte pro výpočet katalytické aktivity LD vztažené na 1 l neředěného séra a interval 1 s při aplikaci molárního absorpčního koeficientu koenzymu NADH pro 340 nm:

$$LD (\mu\text{kat/l}) = \Delta A_{340} \cdot 136,7$$

Vysvětlení výpočtu:

Při výpočtu enzymové aktivity vycházíme z **Lambert-Beerova zákona**:

(1)

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

(2)

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \quad \Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d}$$

(3)

$$\text{katalytická aktivita enzymu} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{V}{v} \cdot 10^6 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

Pro změnu koncentrace použijeme výraz z rovnice 2, 1/60 je přepočet z minuty na sekundy a V/v vyjadřuje ředění séra. Jednotkou enzymové aktivity je kat = mol·s⁻¹. V klinicko-biochemických stanoveních se používají µkataly (1 kat = 10⁶µkat).

Při stanovení konkrétního enzymu, v našem případě laktátdehydrogenasy dosadíme do rovnice 3 resp. 4 konkrétní údaje.

(4)

$$\text{katalytická aktivita enzymu LD} = \frac{\Delta A_{340}}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{V}{v} \cdot 10^6 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

(5)

$$\text{katalytická aktivita enzymu LD} = \frac{\Delta A_{340}}{6,22 \cdot 10^3} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{1,02 \cdot 10^{-3}}{0,02 \cdot 10^{-3}} \cdot 10^6 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

(6)

$$\text{katalytická aktivita enzymu LD} = \Delta A_{340} \cdot 136,7 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$$

symbol		jednotka	konkrétní údaje pro LD a použitou metodu
V	celkový objem vzorku v kyvetě	l	1,02 · 10⁻³
v	objem přidaného séra	l	0,02 · 10⁻³
ε	molární absorpční koeficient (pro NADH při 340 nm)	l · mol ⁻¹ · cm ⁻¹	6,22 · 10³
d	šířka vrstvy v kyvetě	cm	1
10⁶	převod z mol na μmol		10 ⁶
60	převod z min na sec		60

Pozn. první tři údaje (vytištěné tučně) se mění se stanovovaným enzymem a použitou metodou, další tři - šířka vrstvy v kyvetě, převod z mol na μmol, převod z min na sec jsou zpravidla stejná pro všechna kinetická stanovení enzymových aktivit stanovovaných Warburgovým optickým testem.

Referenční hodnoty LD v séru (37 °C): 2,9 – 8,6 μkat · l⁻¹

Úloha 2 – Důkaz specifičnosti enzymů

Princip:

Enzymy působí specificky jak vzhledem k **typu** katalyzované reakce, tak i vzhledem k **substrátu**. Pokud jde o **substrát**, mají některé enzymy poměrně širokou **specifičnost**, např. některé esterázy štěpí nejrůznější přirozené i umělé estery. Jiné enzymy mají specifičnost velice úzkou, jako např. ureáza, která štěpí pouze močovinu. V této úloze vyzkoušíme, jaká je specifičnost **sacharázy** z kvasnic a slinné **amylázy**. Oběma enzymům jako substrát nabídneme sacharózu a škrob. Amyláza štěpí α -1,4-glykosidové vazby ve struktuře škrobu, produktem je směs oligosacharidů. Sacharáza hydrolyzuje sacharózu na glukózu a fruktózu. Jelikož v obou případech vznikají redukující sacharidy, zatímco výchozí substráty redukující nejsou, štěpení substrátu můžeme prokázat Fehlingovou zkouškou.

Podrobněji k používaným enzymům:

Glykosidázy patří mezi hydrolázy (podpodtřída 3.2.1 mezinárodní nomenklatury enzymů). Jsou specifické vůči **typu glykosidové vazby** (α -glykosidázy nebo β -glykosidázy).

Amyláza, ať už rostlinného nebo živočišného původu, štěpí **1,4- α -glykosidové** vazby škrobu, glykogenu a polysacharidů. Vazby β -glykosidové, např. v celulóze, hydrolyzovat nedokáže.

Jako **α -amyláza** (EC 3.2.1.1.) se označuje enzym, který se vyskytuje ve slinách a pankreatické šťávě živočichů. Štěpí **endohydrolýzou 1,4- α -glykosidové vazby** polysacharidů obsahujících tři a více 1,4- α -glykosidově vázaných glukózových jednotek. Výsledkem hydrolytického štěpení amylózy je směs **maltózy** a **glukózy** s hemiacetalovými hydroxyly uvolněnými jako **α -anomer**. Amylopektin a glykogen štěpí α -amyláza náhodně na 1,4- α -glykosidových vazbách, přičemž **1,6- α -** vazby zůstávají nedotčeny. Výslednými produkty tak jsou **větvené** i **nevětvené oligosacharidy**. Enzymová hydrolyza **škrobu** α -amylázou má několik fází, které se projeví také reakcí s jódem. Škrob se barví jódem temně modře, štěpné polysacharidy – dextriny fialově (amylodextrin), purpurově až červeně (erytrodextrin), popř. se nebarví jódem vůbec (achrodextrin). Během štěpení škrobu také ve směsi přibývá redukujících cukrů.

Jako **β -amyláza** (EC 3.2.1.2) se označoval enzym **rostlinného původu**, obsažený např. ve sladu, který štěpí 1,4- α -glykosidové vazby od neredukujícího konce polysacharidového řetězce. Z amylózy vzniká maltóza, která se uvolňuje jako β -anomer, dochází tedy k inverzi. Amylopektin tento enzym štěpí rovněž z neredukujícího konce až k větvení 1,6- α -, které už tento enzym rozštěpit nemůže. Konečný produkt tohoto typu hydrolyzy škrobu je tzv. limitní dextrin. Ani živočišná α -amyláza, ani rostlinná β -amyláza tedy **neštěpí vazby 1,6- α -**, ani **1,4- β -glykosidovou vazbu**.

Jako tzv. **γ -amyláza** (glukoamyláza, EC 3.2.1.20) se označuje enzym obsažený v **membráně enterocytů** tenkého střeva. Je termostabilní (proto též označení *termostabilní maltáza*), štěpí **polysacharidy** a ještě lépe **maltózu**. Hydrolyza probíhá od neredukujícího konce, štěpí se při ní vazby **1,4- α** a výsledným produktem je **β -glukóza**.

Sacharáza z kvasnic je **β -fruktofuranosidáza**, která štěpí β -glykosidovou vazbu v sacharóze. Na první pohled podobná **sacharáza z kartáčového lemu enterocytů** tenkého střeva savců, sacharosa- α -D-glukohydrolasa (EC 3.2.1.48), má odlišnou specifičnost – štěpí α -glykosidovou vazbu, takže kromě **sacharózy** hydrolyzuje i **maltózu**.

Vazby **1,6- α -**, které zůstávají v **isomaltóze**, **amylopektinu**, **glykogenu** a **oligosacharidech**, jež vznikly v tenkém střevě trávením škrobu a glykogenu α -amylázou, se odbourávají převážně **isomaltázovou** podjednotkou **sacharázového-isomaltázového komplexu** kartáčového lemu, oligosacharid- α -glukohydrolázou, (oligo-1,6-glukosidáza, EC 3.2.1.10.).

Sacharázový-isomaltázový komplex kartáčového lemu se syntetizuje jako jediný polypeptidový řetězec. Proteolytické enzymy z lumen tenkého střeva pak tento bílkovinný řetězec naštěpí, čímž vzniknou samostatné funkční podjednotky sacharázového-isomaltázového komplexu. Obě podjednotky katalyzují hydrolyzu **maltózy** (reprezentují asi 80 % veškeré maltázové aktivity tenkého střeva). Kromě toho dokáže **sacharázová** podjednotka štěpit i **sacharózu**. Jak uvedeno výše, **isomaltázová** podjednotka může také odbourávat vazby **1,6- α -** např. v isomaltóze či v dextrinech.

Reagencie:

1. Škrobový maz 10 g/l (1 g škrobu třepat nebo zahřívát s vodou, suspenzi lít pomalu do 100 ml vroucí vody, povařit 2–3 minuty)
2. Sacharóza 10 g/l (roztok denně čerstvý)
3. Sacharáza z kvasnic
4. α -amyláza: sliny zředěné v poměru 1:10

5. Fehling I: $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 70 g/l



6. Fehling II: NaOH 250 g a vinan draselný-sodný 350 g v 1 l čišťené vody



7. Lugolův roztok: jód 20 g v 1 l nasyceného roztoku jodidu draselného; pro použití se ředí 5 kapek Lugolova roztoku do 10 ml čišťené vody

Pracovní postup

1. Připravte roztok amylázy: v kádince zřeďte malé množství vlastních slin čišťenou vodou přibližně 10 $\times$.
2. Očíslujte čtyři dlouhé zkumavky a smíchejte v nich reakční směsi dle tabulky:

	1	2	3	4
Škrob	5ml	-	5 ml	-
Sacharóza	-	5 ml	-	5 ml
Amyláza	1 ml	1 ml	-	-
Sacharáza	-	-	1 ml	1 ml

3. Všechny zkumavky inkubujte 30 minut v termobloku při 37°C.
4. Připravte asi 10 ml Fehlingova činidla: v kádince smíchejte přibližně stejné díly roztoků Fehling I (CuSO_4) a Fehling II (vinan sodno-draselný s NaOH).
5. Použijte Fehlingovu zkoušku k detekci štěpení substrátu: Vezměte čtyři nové dlouhé zkumavky, očíslujte je, do každé dejte asi 1 ml připraveného Fehlingova činidla a přidejte několik kapek z odpovídající původní reakční směsi. Zkumavky zahřívejte ve vroucí vodní lázni a sledujte barevné změny. Původní Fehlingovo činidlo je tmavě modré. Změna zbarvení do zelené, oranžové nebo červené znamená tvorbu Cu_2O a je důkazem přítomnosti redukujících látek, tedy v našem případě štěpení substrátu.
6. Zjistěte, ve kterých zkumavkách zůstal nerozštěpený škrob: zřeďte si ve zkumavce Lugolův roztok (5 kapek/asi 10 ml vody). Přibližně 1 ml každého testovaného roztoku přeneste do nové zkumavky a přidejte několik kapek ředěného Lugolova roztoku. Přítomnost škrobu se projeví jako tmavě modré zbarvení.

Úloha 3 – Vliv pH na aktivitu enzymu

Princip:

Vliv pH na aktivitu enzymu si ukážeme na příkladu pepsinu. **Pepsin** je trávicí enzym, který štěpí bílkoviny. Různé živočišné druhy tvoří různé, mírně odlišné formy pepsinu s různým označením. Všechny patří do skupiny **aspartátových endopeptidáz** (EC 3.4.23), tj. v aktivním centru obsahují dva proti sobě orientované zbytky kyseliny asparagové, které se podílejí na kyselé katalýze.

Pepsiny nejlépe pracují v kyselém prostředí. U člověka vzniká aktivní pepsin z neaktivního prekurzoru, pepsinogenu, odštěpením části polypeptidového řetězce. K této aktivaci může dojít buď samovolně (**autoaktivací**) při pH nižším než 5, nebo působením již aktivní molekuly pepsinu (**autokatalýzou**). Peptidy, které se během aktivace pepsinogenu odštěpily, zůstávají navázané na pepsin a působí jako **inhibitory** pepsinové aktivity. Posledním krokem aktivace enzymu tak je oddělení těchto inhibičních peptidů, k němuž dojde při poklesu pH prostředí pod 2.

Lidský **pepsin A** má 5 molekulárních forem. Hydrolyzuje peptidové vazby uvnitř polypeptidového řetězce (endohydrolyza), přičemž je specifický k oblastem, které obsahují hydrofobní aminokyselinové zbytky – především aromatické (Phe), ale i alifatické (Leu). V jiných částech žaludku se podobným mechanismem tvoří i **pepsin B**. Další enzym, **pepsin C**, se u člověka označuje také jako **gastriksin**. Štěpí endohydrolyzou přednostně peptidové vazby za zbytkem aminokyseliny Tyr a je méně specifický než pepsin A.

Optimální pH pepsinu poněkud kolísá podle toho, jaký substrát má tento enzym hydrolyzovat. Např. pro vaječný albumin je pH optimum pepsinu A kolem 1,5, pro hemoglobin je vyšší (2,3).

V této praktické úloze se pokusíme odhadnout, v jaké oblasti leží pH optimum pepsinu pro bílkoviny vaječného bílku.

Reagencie:

1. Roztok pepsinu 10 g/l



2. Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l

3. Suspenze vaječného bílku (vařený bílek se homogenizuje ve fyziologickém roztoku – konečná koncentrace asi 300 g/l).

Pracovní postup:

Do čtyř očíslovaných zkumavek odměřte roztoky podle tabulky (suspenzi vaječného bílku před použitím protřepat!) **Pracovní postup:**

Do čtyř očíslovaných zkumavek odměřte roztoky podle tabulky (suspenzi vaječného bílku před použitím protřepat!):

	1	2	3	4
Konečné pH	1,2	1,5	2,5	Kontrola
Roztok pepsinu ml	2	2	2	-
HCl ml	4	2	0,2	2
Čištěná voda ml	-	2	3,8	4
Suspenze bílku ml	1	1	1	1

Inkubujte zkumavky přibližně **10 minut** při 37°C v termobloku.

Vyhodnocení:

Po skončení inkubace se hodnotí projasnění obsahu zkumavek, ke kterému došlo natrávením bílkovin vaječného bílku. Použijte semikvantitativní stupnici, např.: + úplné projasnění, +/- částečné projasnění a - přetrvávající zákal.

Výsledky запиšte do tabulky v protokolu a určete, v jaké oblasti pH leží optimum pro práci enzymu.

Úloha 4 – Oxidoreduktázy

Většina energie v živočišném organismu pochází z oxidoredukčních pochodů. Oxidační produkty reakce mají menší obsah energie než výchozí reagující látky a energie je uvolňována jako teplo nebo je transformována na jiné druhy využitelné energie, např. na energii chemické vazby. Četné oxidace jsou spojeny s tvorbou „makroergických“ fosfátových esterů anhydridové povahy (ATP, ADP), jež mají zvláštní důležitost při konzervaci a přenosu energie. Vytvářejí se z energie uvolněné v buňce při oxidačních reakcích. Oxidoredukce mohou probíhat anaerobně, např. v glykolýze, nebo aerobně, např. při oxidaci substrátů citrátového (Krebsova) cyklu nebo □-oxidací mastných kyselin v mitochondriích.

Cukry, lipidy a bílkoviny představují zdroje energie v organismu, ale oxidace neprobíhají většinou přímo s molekulárním kyslíkem ani při aerobních oxidoredukcích (s výjimkou tzv. oxygenáz).

Při oxidoredukčních pochodech v mitochondriích je přenášen vodík ze substrátů na kyslík řadou přenašečů, jež vytvářejí mezi sebou přesně navazující systém enzymů. Tento řetěz oxidoredukčních pochodů (buněčné dýchání) probíhá ve dvou stupních:

1. Přenos vodíku účinkem dehydrogenáz, jež obsahují jako koenzym pyridin- a flavinnukleotidy.

2. Přenos elektronů zejména prostřednictvím cytochromů (v mitochondriích). Významný je poslední stupeň, kde autooxidabilní cytochromoxidáza reaguje přímo s molekulárním kyslíkem za tvorby vody.

Oxidoredukční sled reakcí probíhá ve vnitřní mitochondriální membráně v tzv. dýchacím (respiračním) řetězu, který je velmi schematicky vyjádřen jako dvouelektronový přenos, neboť molekulám organických substrátů jsou elektrony prostřednictvím dehydrogenázových koenzymů při biologických oxidacích odnímány v párech. Na úrovni cytochromů je však přenos jednoelektronový a na úrovni cytochromoxidázy při redukci molekuly O_2 čtyřelektronový.

Při dvouelektronovém přenosu ze substrátů (nejčastěji citrátového cyklu) na molekulární kyslík se současně vytvářejí molekuly ATP - tzv. aerobní (oxidační) fosforylace.

Akceptorem elektronů však nemusí být vždy kyslík. Některé dehydrogenázy odevzdávají elektrony i jiným akceptorům, např. pyruvátu (laktátdehydrogenáza) nebo *in vitro* i arteficiálním akceptorům, jako je methylenová modř (flavinové dehydrogenázy). Jde tu o anaerobní oxidoredukce.

V našem cvičení bude modelově demonstrována oxidoredukce glukózy vzdušným kyslíkem za katalýzy methylenovou modří, která bude fungovat jako dočasný akceptor elektronů. Její redukovaná forma (leukobáze) je bezbarvá, ale je autooxidabilní a třepáním se vzduchem opět přechází v barevnou oxidovanou formu.

Z dehydrogenáz, kromě laktátdehydrogenázy, bude ukázána dehydrogenace xanthinoxidoreduktázou (xanthinoxidázou) z mléka, kde substrátem bude formaldehyd a akceptorem elektronů methylenová modř.

Dehydrogenace xanthinoxidoreduktázou (xanthinoxidázou)

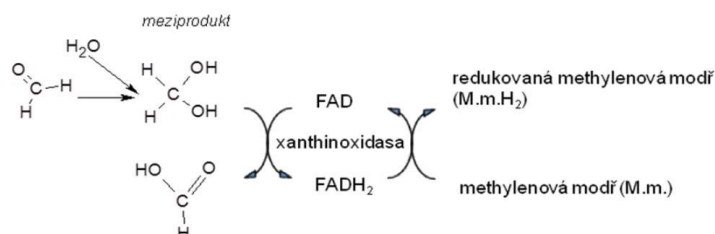
Princip:

Xanthinoxidáza (EC 1.17.3.2) je relativně nespecifická dehydrogenáza obsažená např. v mléce (Schardingerův enzym), v savčích játrech a mnoha dalších tkáních. Jejím působením vzniká z purinů (hypoxanthinu a xanthinu) jejich degradační produkt, kyselina močová. Kromě toho xanthinoxidáza může oxidovat i pteriny a další substráty, mj. i jednoduché aldehydy (má tedy i aktivitu aldehydoxidázy EC 1.2.3.1). Je to flavinový enzym, jehož koenzymem je flavinadenindinukleotid (FAD), avšak v aktivním centru obsahuje též atomy kovů (Mo, Fe). Dehydrogenací substrátu vzniká $FADH_2$, který může být reoxidován molekulárním kyslíkem (autooxidace) za vzniku H_2O_2 , nebo arteficiálním akceptorem (methylenová modř). Enzym není inhibován kyanidem, ale varem se ničí.

V savčích játrech a jiných tkáních za fyziologických okolností *in vivo* existuje xanthinoxidáza převážně v tzv. dehydrogenázové D-formě (EC 1.17.1.4), která reoxiduje $FADH_2$ proti dalšímu koenzymu NAD^+ . Poškozením této D-formy za patologických okolností a též při nešetrné práci

s enzymem *in vitro* ztrácí D-forma vazebné místo pro NAD^+ a mění se tak na oxidázovou O-formu (EC 1.17.3.2).

Jako nespecifický substrát použijeme v našem pokuse roztok formaldehydu, jako akceptor elektronů pro reoxidaci FADH_2 methylenovou modř a jako zdroj enzymu nepasteurované kravské mléko.



Reagencie:

1. Mléko nesvařené (nepasteurované)
2. Mléko svařené

3. Methylenová modř 0,5 g/l



4. Roztok formaldehydu 4 g/l

5. KCN 10 g/l



Pracovní postup:

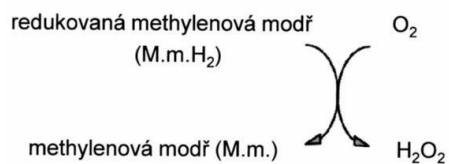
1. Do tří zkumavek připravte reakční směs podle tohoto schématu:

	1	2	3
Čerstvé mléko	2 ml	-	2 ml
Svařené mléko	-	2 ml	-
Methylenová modř	100 μl	100 μl	100 μl
KCN (pozor jed!!!)	-	-	0,2 ml
Deionizovaná H_2O	0,2 ml	0,2 ml	-
formaldehyd	250 μl	250 μl	250 μl
Obsah zkumavek dobře promíchat			
Parafínový olej * (převrstvit ihned po promíchání)	1 ml	1 ml	1 ml

Pozn. * Parafínový olej má zabránit autooxidaci (zajistit anaerobní průběh reakce)

2. zkumavky vložte do suchého bloku, inkubujte při 37 °C a kontrolujte průběh reakce přibližně každých 5 minut, až zkumavka č. 1 je zcela odbarvená.

3. Zkumavku č. 1 protřeptejte se vzduchem a mléko opět zmodrá, neboť probíhá reakce:



4. Po vložení zpět do termobloku se methylenová modř opět odbarví.

Vyhodnocení:

Srovnajte a popište výsledky ve zkumavce č. 2 a 3 a srovnajte se zkumavkou č. 1. Vysvětlete výsledky.