

1. Zajęcia organizacyjne

Plan zajęć:

1. Zapoznanie się z regulaminem laboratorium oraz podstawowymi przepisami BHP

2. Ogłoszenie podstawowych kryteriów oceny:

Warunkiem zaliczenia ćwiczeń laboratoryjnych jest obecność na wszystkich zajęciach, wykonanie wszystkich eksperymentów przewidzianych programem zajęć, pozytywna ocena z 4 kolokwium wejściowych oraz analiza uzyskanych wyników w formie sprawozdania pisemnego. Każdą ocenę negatywną należy poprawić. Ocena z ćwiczeń „bardzo dobra” pozwala podejść do terminu „0” egzaminu z Podstaw Enzymologii.

3. Ogłoszenie podstawowych zagadnień do przygotowania na poszczególne zajęcia

(o szczegółowych zagadnieniach decyduje prowadzący ćwiczenia).

- Ćwiczenie nr 2 pt. *Hydroliza lipidów mleka za pomocą lipazy trzustkowej*:
biologiczne funkcje lipidów, podział lipidów, ogólna budowa tri-, di- i monoacylogliceroli, kwasy tłuszczowe nasycone (palmitynowy i stearynowy) i nienasycone (oleinowy) – zasady nazewnictwa; budowa enzymu (miejsce aktywne), model „klucza i zamka”; model indukowanego dopasowania, regiospecyficzność i acylospecyficzność lipaz, stereospecyficzność enzymów, trawienie lipidów w organizmie
 - Ćwiczenie nr 3 pt. *Badanie kinetyki enzymów*:
model Michaelisa-Menten, równanie Michaelisa-Menten (wraz z wyprowadzeniem), parametry kinetyczne (V_{\max} , $k_{\text{cat}} = V_{\max}/E_0$, K_M i k_{cat}/K_M), wykresy: Michaelisa-Menten, Lineweavera-Burka, graficzna ilustracja (wykres Michaelisa-Menten i Lineweavera-Burka) wpływu inhibitora kompetycyjnego, akompetycyjnego i niekompetycyjnego na aktywność enzymatyczną, cel stosowania substratów chromogeniczny, budowa *p*-nitroanilidu benzoil-D,L-argininy oraz *p*-guanidynobenzoenu *p*'-nitrofenylu, specyficzność substratowa wybranych proteinaz serynowych - trypsyny, chymotrypsyny i elastazy; pojęcia: proteazy, proteiny, endopeptydazy, egzopeptydazy.
 - Ćwiczenie nr 4 pt. *Oznaczanie zawartości kwaśnej fosfatazy w homogenacie z ziemniaka*:
budowa białek (struktury 1-, 2-, 3- i 4-rzędowe), budowa enzymów (enzymy proste, złożone, apoenzym, kofaktor, holoenzym), miejsce aktywne enzymu, klasyfikacja enzymów, zasady nazewnictwa enzymów, budowa lizosomu, funkcje fosfataz, prawa absorpcji (absorbancja, transmitancja, prawo Lamberta-Beera), jednostki aktywności enzymatycznej (standardowa U, katal); wzór *p*-nitrofenylofosforanu.
 - Ćwiczenie nr 5 pt. *Badanie rozkładu skrobi przez α -amylazę*:
występowanie, budowa i funkcje amylaz, optymalne warunki działania amylazy ślinowej i trzustkowej, przykładowe zastosowanie α -amylazy w przemyśle (produkcja alkoholi, środki do mycia), enzymy produkowane i wydzielane przez trzustkę, budowa i rola skrobi, budowa dekstryn i maltozy, wpływ pH i temperatury na aktywność enzymów, trawienie cukrów w organizmie
4. Przygotowanie odczynników:
- Przygotowanie **0,1 M buforu cytrynianowego pH 5,2**
Przygotować 200 mL 0,1 M kwas cytrynowy ($C_6H_8O_7 \times H_2O$, $M=210,14$ g/mol) oraz 400 mL 0,1 M cytrynian sodu ($C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ $M=294,12$ g/mol). Zmieszać 170 mL roztworu kwasu i 387,3 mL roztworu soli.

- Przygotowanie buforu: **50 mM Tris/HCl** z dodatkiem **20 mM CaCl₂**, pH 8,3
6,055 g Tris (Trizma base, CAS 77-86-1, M = 121,14 g/mol) oraz 2,22 g CaCl₂ (M = 110,98 g/mol) rozpuścić w 950 mL H₂O destylowanej. Za pomocą 2 M roztworu HCl doprowadzić pH do wartości 8,3 (pH kontrolować papierkami wskaźnikowymi). Dopełnić do 1000 mL H₂O. Dodać 2 krople Tritonu X-100 zapobiegającego agregacji białka oraz jego adsorpcji na ściankach kuwet.
- Przygotowanie buforu: **40 mM weronal** z dodatkiem **20 mM CaCl₂**, pH 8,3
3,7 g weronalu (M.W.=184,19 g/mol, CAS 57-44-3, UWAGA: rozpuszczalność w wodzie wynosi 7,46 g/L) oraz 1,11 g CaCl₂ rozpuścić w 450 mL H₂O destylowanej. Za pomocą 5 M roztworu NaOH (5g/25 mL H₂O) doprowadzić pH do wartości 8,3. Dopełnić do 500 mL H₂O. Dodać 2 krople Tritonu X-100 (zapobiega adsorpcji białka na ściankach kuwet).
- Przygotowanie **wodnego roztworu HCl pH 3** z dodatkiem **20 mM CaCl₂**
Do 250 mL H₂O destylowanej dodać 23 µL stężonego 36% kwasu solnego. Wartość pH określić za pomocą papierka wskaźnikowego. Do 250 mL roztworu HCl pH 3 dodajemy 555 mg CaCl₂.
- Przygotowanie buforów McIlvaina (ćwiczenie 5)
Przygotować 600 mL 0,1 M kwasu cytrynowego (C₆H₈O₇ × H₂O, M=210,14 g/mol) oraz 300 mL 0,2 M Na₂HPO₄ (M=141,96 g/mol).
Przygotowanie **buforu o pH 3** – zmieszać 317,8 mL roztworu kwasu cytrynowego i 82,2 mL roztworu Na₂HPO₄.
Przygotowanie **buforu o pH 5** – zmieszać 194,0 mL roztworu kwasu cytrynowego i 206,0 mL roztworu Na₂HPO₄.