

**49-ая Эстонская Школьная
биологическая олимпиада
Практическая работа по биохимии**



Имя :

Фамилия :

Школа :

Класс :

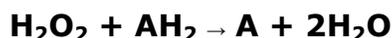
Группа :

Руководители : Калле Киппер и Маарья Сооман

Определение активности пероксидазы в овощах, фруктах и свинине

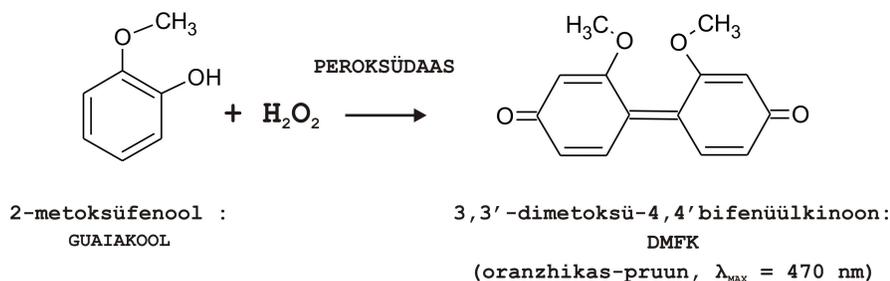
Введение

Пероксидаза это фермент, который катализирует в растениях окисление различных органических веществ пероксидом водорода H_2O_2 по следующей схеме:



где AH_2 означает соответственно восстановленную форму реагента и A - его окисленную форму. Одной из клеточных функций пероксидазы является восстановление образовавшегося в процессе обмена веществ пероксида H_2O_2 до воды. Донором электронов или восстановителем могут быть разные, образовавшиеся в растении вещества, например, аскорбиновая кислота, ауксин, а также разнообразные фенольные соединения.

В данной практике мы изучим активность пероксидазы в различных фруктах, овощах и в мясе свиньи. Для измерения активности пероксидазы, в качестве восстановителя мы используем органическое соединение гваякол или 2-метоксифенол, а окислителем будет пероксид водорода. При реакции катализируемой пероксидазой, гваякол окисляется до органического вещества яркого цвета, но имеющее труднопроизносимое название ДМФК или 3,3'-диметокси-4,4'-бифенилхинон:



ДМФК поглощает свет с длиной волны 470 нм. Поэтому, за ходом реакции, катализируемой пероксидазой, можно наблюдать с помощью спектрофотометрии при длине волны 470 нм. Измерив количество белка в растительном материале, можно оценить удельную активность полученных из разных растений препаратов.

Требуемые реагенты

- 50 мМ Na-ацетатный буфер (рН 5)
- 500 мМ Na-ацетатный буфер (рН 5)
- 90 мМ гваякол (2-метоксифенол)
- 10 мМ ДМФК (3,3'-диметокси-4,4'-бифенилкинон)
- 100 мМ H₂O₂
- Бычий сывороточный альбумин или БСА (1 mg/ml)
- реагент Бредфорда
- экстракт из свинины/редиса/моркови/яблока

Другие средства

- Автоматические пипетки
- Наконечники на пипетки
- Мерные цилиндры
- 1.5 мл микроцентрифужные пробирки
- Конические колбы
- Кюветы для спектрофотометра
- Спектрофотометры
- Резиновые перчатки
- Терка

Практическая часть

1. Приготовление экстрактов

Приготовление экстракта из животного/растительного материала происходит в группах состоящих из четырех учеников. Каждый член группы изготавливает один из четырех экстрактов.

Для приготовления растительного экстракта натрите 10 г редиса/моркови/яблока на фольгу для выпечки и перенесите полученный материал в 100 миллилитровую коническую колбу. Добавьте к материалу 80 мл 50 мМ Na-ацетатного буфера и взбалтывайте материал в течении примерно одной минуты. Дайте материалу 5 минут осесть. Покрывающая осадок жидкость и есть необходимый в дальнейшем экстракт. **Каждый из вас возьмет пипеткой для себя 1 мл каждого экстракта в 1,5 мл пробирку.**

Для приготовления животного экстракта перенесите 1 г свиного фарша в 15 миллилитровую микроцентрифужную пробирку и добавьте туда 50 мМ Na-ацетатного буфера до отметки 13 мл. Хорошо смешайте суспензию. **Каждый возьмет пипеткой 1 мл данной суспензии в 1,5 мл пробирку и отцентрифугирует ее на настольной центрифуге при 13000 об/мин в течении 2-х минут. Каждый отпипетирует 0,5 мл супернатанта (жидкости находящейся над осадком) в новую 1,5 мл пробирку – это будет использоваться в последующих опытах.**

2. Определение активности пероксидазы в биологических препаратах.

В каждом экстракте вы должны померять активность содержащегося в нем энзима пероксидазы – т.е. сколько моль продукта в единицу времени (напр. 1 минута) катализирует пероксидаза. Для этого вы будете наблюдать окисление гваякола (2-метоксифенола) пероксидом водорода H_2O_2 – реакцию, которую катализирует пероксидаза. Результатом окисления гваякола является образование цветного вещества **ДМФК** (3,3'-диметокси-4,4'-бифенилкинон), концентрацию которого возможно измерить спектрофотометрически при длине волны 470 нм. В контрольном опыте вместо экстракта используйте 50 мМ Na-ацетатный буфер.

1. Приготовьте 15 мл «реагента гваякола»:

(4 балла)

Реагент	Количество (мл)	Конечная концентрация
Гваякол (90 мМ)		9 мМ
H_2O_2 (100 мМ)		10 мМ
Na-ацетат (500 мМ)		50 мМ
Дест. H_2O		55 М
всего	15 мл	

2. В каждую из четырех микроцентрифужных пробирок отпипетируйте 100 мкл соответствующего экстракта. В пятую пробирку такое же количество 50мМ Na-ацетатного буфера.
3. Добавьте в каждую из пяти проб 900 мкл «реагента гваякола» и продержите пробы 10 минут при комнатной температуре
4. Измерьте оптическую плотность проб при длине волны 470 нм (OD_{470}) и запишите результаты в таблицу ниже ***NB! Для пробы самого темного цвета сделайте 10 х разбавление в Na-ацетатном буфере до конечного объема 1 мл.*** Для измерения используйте одну и ту же спектрофотометрическую кювету.

Таблица 1

	OD_{470}	dOD_{470} ($OD_{\text{Проба}} - OD_{\text{Контроль}}$)
Контроль		
Редис		
Морковь		
Яблоко		
Свинина		

5. Изготовьте 1 мл **20 х разбавления** из 10 мМ ДМФК и измерьте OD_{470} этого разбавления:

$$OD_{470} =$$

6. На основе полученных результатов, высчитайте концентрацию ДМФК в своих пробах и среднюю скорость образования ДМФК, что и будет средней активностью пероксидазы (мМ/мин):

Таблица 2**(4 балла)**

	dOD_{470}	ДМФК (мМ)	Активность (мМ/мин)
Редис			
Морковь			
Яблоко			
Свинина			

3.Измерение количества белка в экстрактах

1. Приготовьте из начального раствора сывороточного альбумина (БСА) 6 растворов с разной концентрацией объемом 100 мкл в 50 мМ Na-ацетатном буфере:

(3 балла)

БСА (мг/мл)	БСА нач. раствор (мкл)	Буфер (мкл)
0,00		
0,10		
0,20		
0,30		
0,40		
0,50		

2. В разные микроцентрифужные пробирки отпипетируйте 100 мкл соответствующего **растительного** экстракта. Из экстракта **свинины** сделайте предварительно 10 х разбавление до конечного объема 100 мкл.
3. Добавьте к экстрактам и растворам БСА 900 мкл реагента Бредфорда и продержите пробы 5 минут при комнатной температуре
4. Измерьте оптические плотности всех проб при длине волны 600 нм и запишите все полученные результаты измерений при OD₆₀₀ в таблицу 3. NB! Сначала измерьте OD₆₀₀ у стандартных растворов альбумина (БСА). Затем измерьте оптическую плотность у проб экстрактов.

Таблица 3 :

БСА (мг/мл)	OD ₆₀₀	dOD ₆₀₀
0,00		
0,10		
0,20		
0,30		
0,40		
0,50		
Экстракт		
Редис		
Морковь		
Яблоко		
Свинина (10 х разб.)		

5. Посчитайте концентрацию белка (мг/мл) в исследуемых экстрактах, используя данные стандартных растворов БСА. Для этого нарисуйте, прежде всего, на листе в клетку график, где на оси x будет концентрация БСА в мг/мл, а на оси y - OD_{600} . Затем на глаз, используя линейку, нарисуйте прямую и посчитайте коэффициент наклона.

Наклон: (единицы:) (5 баллов)

Зная значение коэффициента наклона и OD_{600} изучаемых проб, вычислите концентрацию белка в экстрактах. Запишите значения концентраций в график ниже:

Табель 4 :

(4 балла)

Экстракт	Концентрация (мг/мл)
Редис	
Морковь	
Яблоко	
Свинина	

4. Измерение специфической активности пероксидазы

Вдобавок к активности энзима, есть также еще одна очень важная величина, характеризующая энзиматический препарат, которая называется **УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ**. Удельная активность показывает активность на единицу количества энзима. Например, активность на мг или ммоль энзиматического препарата. Удельная активность зависит от степени чистоты энзиматического препарата, то есть от того, какое количество других белков, помимо нас интересующего, находится в препарате. Для вычисления удельной активности надо знать i) активность энзима и ii) количество белка в препарате. В данной работе измерялось и то и другое (см. Таблицы 2 и 4). Теперь вам надо посчитать удельную активность препаратов пероксидазы из разных биологических источников. Удельную активность содержащейся во всех четырех экстрактах пероксидазы выразите в единицах: ДФМК(ммоль/л)/мин*мг (белка). При расчетах исходите из данных в таблицах 2 и 4, а также примите в расчет, что каждого экстракта в ваших опытах было 100 мкл=0,1 мл.

(4 балла)

Экстракт	Удельная активность : ДФМК(ммоль/л)/мин*мг(белка)
Редис	
Морковь	
Яблоко	
Свинина	

Дополнительные вопросы:

1. Почему в приготовленных для определения активности пероксидазы пробах, вы использовали буферный раствор, а не дистиллированную воду? **(4 балла)**

2. Почему в опыте по определению активности пероксидазы (работа № 2) вдобавок к четырем пробам экстрактов была пятая проба, куда вместо экстракта был добавлен буфер? **(4 балла)**

3. Почему клетке нужно избавиться от образующегося в процессе обмена веществ пероксида водорода? **(4 балла)**

4. Предположим, что нам удалось увеличить содержание пероксидазы относительно общей массы белков экстракта редиса с 10% до 30% путем хроматографирования. Причем активность полученного после хроматографии препарата пероксидазы стала на 10% выше, чем активность экстракта пероксидазы до хроматографии, но количество белков в обоих случаях было одинаково. Увеличилась или уменьшилась удельная активность препарата пероксидазы после хроматографии (поставьте крестик напротив правильного, по вашему мнению, ответа):
Увеличилась :
Уменьшилась :
(4 балла)