




УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ - СКОПЈЕ
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ



КИРО ИВАНОВСКИ



**П Р И Р А Ч Н И К
ЗА ПРАКТИЧНА
НАСТАВА ПО
НАСТАВНИОТ ПРЕДМЕТ
ОРАЛНА БИОХЕМИЈА**

**Септември 2016
Скопје**

ВОВЕДНИ НАПОМЕНИ

Од излегувањето на практикумот Орална биохемија во печат, во 2012 година па се до денес, биохемиската лабораторија на Катедрата за болести на устата и пародонтот се опреми со дополнителна опрема, со хемикалии и реагенси. Поради тоа студентите имаат можност да изведуваат поголем број на лабораториски вежби во функција на полесно совладување на наставните содржини по предметот Орална биохемија.

Дел од вежбите не се обработени во постоечкиот практикум од 2012 година. Затоа овој прирачник освен што ги обработува лабораториските вежби кои не се присутни во практикумот, служи и како водич за практичната настава по наставниот предмет Орална биохемија, до излегување на нов практикум.

Пожелно е студентите да имаат и т.н. „**бела тетратка**” во која ќе забележуваат кој експеримент изведувале, резултатите кои ги добиле, одредени објаснувања кои се презентерини на вежбите итн. За соодветна подготвеност за практичната настава по наставниот предмет Орална биохемија, студентот задолжително треба да ги користи и практикумот од 2012 и овој прирачник.

проф. д-р Киро Ивановски

ПРОЦЕНКА НА ПОДГОТВЕНОСТ НА СТУДЕНТОТ ЗА ПРАКТИЧНА НАСТАВА ПО НАСТАВНИОТ ПРЕДМЕТ ОРАЛНА БИОХЕМИЈА

За секоја вежба студентот ќе биде оценуван според теоретската подготвеност на материјата која се обработува на вежбата како и според неговото активно вклучување во практичното изведување на лабораториската вежба. Табелата со описот за бодирањето на студентот е дадена во табелата бр. 1.

Табела бр. 1. Проценка на подготвеноста на студентот и описот на бодирање.

опис	бодови
Студентот не е подготвен за вежби и не се вклучува активно во практичната работа (асистентот има право да го отстрани таквиот студент од вежби).	0
Студентот делумно е подготвен за вежби а не се вклучува активно во практичната работа.	0,1
Студентот не е подготвен за вежби а се вклучува активно во практичната работа.	0,3
Студентот делумно е подготвен за вежби, се вклучува активно во практичната работа но не ја разбира материјата и не знае во целост да ги објасни добиените резултати.	0,7
Студентот е подготвен за вежби, се вклучува активно во практичната работа и знае да дискутира и да ги објасни добиените резултати.	1
На последната 10-та вежба, студентите изведуваат една од деветте вежби кои ги работеле во текот на семестарот, дискутираат со професорот и одговараат на неговите прашања.	0-6

ВЕЖБА бр. 1: ВОВЕД ВО ПРЕДМЕТОТ, ЗАПОЗНАВАЊЕ СО РАБОТАТА И ПРАВИЛАТА ЗА РАБОТА ВО БИОХЕМИСКАТА ЛАБОРАТОРИЈА.

Цел: да се запознаат студентите со просторот, опремата и лабораторискиот инвентар со кој ќе работаат во текот на вежбите.

Асистентот ги запознава студентите, како полесно да се саноѓаат во лабораторијата и заедно со студентите го разгледуваат и дискутираат правилникот за однесување во биохемиска лабораторија.

На вежбите по предметот Орална биохемија присуствуваат 2 групи од по 5 студенти. Студентите работаат на строго определени работни места во лабораторијата. Во лабораторијата постојат 5 работни места. На секое работно место се присутни по 2 студенти. Во текот на семестарот студентите не ги менуваат работните места. Во текот на вежбите, не е пожелно да се напушта работното место од страна на студентите. Тие имаат право да го напуштат работното место само за да земаат реагенс, потребен лабораториски инвентар или пак да ги однесат епруветите на местото за дезинфекција.

Сите студенти се одговорни за правилата на работење во лабораторијата и ги сносат трошоците на невнимателно уништена опрема или реагенс. На секоја вежба се определуваат по двајца студенти (дежурни), кои ќе го измијат инструментариумот (епрувети, инки, чаши итн.) на сите студенти со кој работеле во текот на вежбата.

Сите студенти задолжително се придржуваат кон Правилникот за однесување во биохемиска лабораторија.

ПРАВИЛНИК ЗА ОДНЕСУВАЊЕ ВО БИОХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

Лабораторијата може да биде опасно место, доколку не сте внимателни. Опасноста се должи на работата со хемикалиите и опремата која ја користите. Стаклото кое го користите при работа секогаш треба да се смета како опасно, бидејќи лесно се крши ако падне или ако со него не се ракува правилно. Единствен начин да се заштите е да бидете прописно облечени (да носите мантил, да користите заштитни ракавици) и по потреба да ставате заштитни наочари.

Поголемиот број на несакани настани во лабораторијата се случуваат заради невнимание. Помалку веројатно е дека, студентите кои се добро подготвени за вежби, ќе предизвикаат некој несакан настан или пак некој ќе повредат во лабораторија.

Во лабораторијата треба да се придржувате кон следните правила:

1. Обрнете внимание со какви хемикалии работите. Секогаш користете ракавици, доколку работите со токсични хемикалии.
2. Во лабораторија носете соодветна облека, обувки и бел мантил.
3. Секогаш исчистете ја работната маса, опремата и садовите (лабораториски чаши, инки, епрувети) кои сте ги користеле. **Работата не е завршена, додека лабораторијата не е средена.**
4. Никогаш не пипетирајте со уста. Секогаш користете пастерова пипета (3мл), гумена пумпа за пипета, шприц со игла или микропипетор.
5. Никогаш не ја оставјте својата пипета во заедничката боца со реагенси. Тоа зборува за Вашата одговорност и однесување. Доколку Ви се потребни 10мл на раствор, претурете нешто повеќе од 10мл од растворот во Вашата чаша а потоа пипетирајте
6. Никогаш не ги носете заедничките боци на Вашето работно место. Никогаш не ги носете епруветите во рака, туку на сталак. Една од најфрустрирачките работи во лабораторијата е да неможете да го најдете тоа што Ви е потребно.
7. Никогаш не земајте повеќе од некоја хемикалија, која Ви е потребна.

ПРАВИЛА НА РАБОТА СО БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛ ОД ХУМАНО ПОТЕКЛО

Речиси на сите вежби ќе работите со плунка, која исто како и крвта и урината, се третира како биолошки материјал.

СИТЕ ХУМАНИ БИОЛОШКИ ПРИМЕРОЦИ ТРЕБА ДА СЕ ТРЕТИРААТ КАКО ДА СЕ ИНФЕКТИВНИ

Универзалните мерки на претпазливост, кон кои треба да се придржувате при работа со крв, **плунка** и други биолошки течности, се дефинирани од страна на Центарот за контрола и превенција на болести (Center for Disease Control and Prevention, USA). Овие мерки се користат за да се спречи контакт со инфицирана плунка, крв или други инфективни материјали:

1. Внимателност при колекцијата на плунката (испитувачот да не биде во непосредна близина на испитаникот кој донира плунка) и придржување кон препораките за колекција на плунката (седечка положба, осветлена просторија итн.). Испитаникот да ја испере устата со дејонизирана вода од чаша, содржината од устата да ја префрли во чашата. Содржината од чашата, пак да се изпразни во сад за отпаден биолошки материјал а чашата да се фрли во корпа за медицински отпад.
2. Задолжително да се носат заштитни ракавици. Се препорачува и носење на заштитни наочари и маски, бидејќи на тој начин се спречува изложувањето на слузокожата на очите, носот и усните од потенцијални фактори на ризик. Овие заштитни мерки се неопходни во ситуации кога може да дојде до прскање на биолошкиот примерок (плунката) и кога се користат јаки токсични хемикалии.
3. Ако кожата или слузокожите дојдат во контакт со крв, плунка или друг материјал, мора веднаш да се исперат со **ЛАДНА** вода(топлата вода ги проширува порите на кожата и

ја олеснува растворливоста на некои опасни материи и хемикалии). Се вадат заштитните ракавици од рацете, рацете се мијат со вода а потоа со 76% етанол.

4. Работните површини на кои се истурил биолошки материјал **ВЕДНАШ** се бришат со јак раствор на натриум-хипохлорид NaOCl (“Варекина “ која содржи 0,5% хлор), а потоа следува испирање со 76% етанол. Мантилите контаминирани со биолошки материјал треба да се деконтаминираат (на пример да се потопи во раствор од “Варекина “) пред да се пере во машина.
5. По испитувањето на биолошкиот материјал (плинката), се одлага во сад за отпаден биолошки материјал, се третира со 3% раствор на натриум-хипохлорид NaOCl (“Варекина “: вода= 3 : 1) во траење од 1 саат, а потоа се истура во канализација (на определено место):
 - иглите кои се користат се за еднократна употреба, по употребата се пакуваат во **сад наменет само за игли**, заради безбедно одложување и отстранување.
 - пластичните шприцеви и пипети кои се за еднократна употреба се фрлаат во корпа за медицински отпад.
 - стаклените садови (епрувети и лабораториски чаши) кои биле во контакт со биолошки материјал пред миењето се потопуваат во дезинфекционо сретство, натриум-хипохлорид NaOCl (десетина минути).
6. Особено внимание треба да се обрне при работа со остри предмети, игли, скалпели, напукнати епрувети за да не настанат повреди, со што се зголемува ризикот од инфекција. **Интактната кожа е прва линија на одбрана на организмот од инфекција.**
7. Лабораториски постапки кои можат да предизвикаат прскање (загревање на епрувети на пламен, силно мешање, користење на концентрирани киселини и алакии) се изведуваат во присуство на асистентот и со погоре неведените мерки на претпазливост
8. Внесување на храна и пијалоци, пушење, употреба на козметика и балзам за усни како и мesteње на леќи за очи, во текот на работата со биолошки материјал се **НАЈСТРОГО ЗАБРАНЕТИ**.
9. Единствено на студентите им е дозволено да работат во лабораторијата. Посети во лабораторијата не се дозволени.
10. Лабораториските инструменти кои се користат треба да бидат испрани и дезинфицирани после работата со биолошки материјал.
11. Вниманието при миењето на рацете е есенцијален дел на добрата пракса. По завршувањето на работата во лабораторијата, рацете се мијат со течен сапун. При често миeње на рацете, како и при користење на заштитни ракавици, се препорачува употреба на хидратантни креми. Доколку студентот има долга коса, таа треба да биде врзана или имобилизирана на некој друг начин.
12. **На крај, се пребришуваат сите работни површини со сретство за дезинфекција (DEZINTAL 0,5%).**

АСИСТЕНТОТ ГО ЗАДРЖУВА ПРАВОТО ДА ГО ОТСТРАНИ СЕКОЈ СТУДЕНТ ОД ЛАБОРАТОРИЈАТА, ДОКОЛКУ НЕ СЕ ПРИДРЖУВА КОН НАВЕДЕНИТЕ ПРАВИЛА

ВЕЖБА бр. 2: СОБИРАЊЕ (КОЛЕКЦИЈА) НА НЕСТИМУЛИРАНА И СТИМУЛИРАНА ПЛУНКА.

Цел: да се запознаат студентите со методите на собирање на плунка и со факторите кои влијаат врз лачење на плунката.

СТУДЕНТИТЕ ЗАДОЛЖИТЕЛНО ДА ГИ ПРОЧИТААТ И ДА СЕ ПОДГОТВАТ ЗА ИЗВЕДУВАЊЕ НА ПРВИТЕ ТРИ ВЕЖБИ ПОМЕСТЕНИ ВО ПРАКТИКУМОТ ОРАЛНА БИОХЕМИЈА.

Потребно за изведување: сталак за епрувети, 5 пластични градуирани епрувети со конусно дно, 2 инки, лимунска киселина, лимун, лабораториска чаша и парафинско блокче или гума за цвакање.

Изведување на вежбата:

- едниот студент колекционира нестимулирана плунка (со методата на плукање) и плунка со механичка стимулација (цвака парафинско блокче или гума за цвакање);
- вториот студент собира, нестимулирана плунка (со методата на истекување), плунка со хемиска (лимунска киселина) стимулација и плунка со психичка стимулација;

ВЕЖБА бр. 3: ОБРАБОТКА (ПРОЦЕСИРАЊЕ) И ЧУВАЊЕ НА ПЛУНКАТА

Плунката во последниве декади се повеќе се користи како дијагностички медиум, благодарение на добрата корелација помеѓу составните компоненти на плунката и нивната концентрација во крвната плазма. Не постои сакогаш можност собраните примероци на плунка да бидат веднаш анализирани. Поради тоа потребно е да се знаат постапките за обработка и чување на собраните примероци на плунка.

Во плунката можат да се определуваат различни составни компоненти: вкупни протеини, одделни класи на протеини, аминокиселини, електролити, хормони, ДНК, холестерол, антиоксинси итн. Постојат одредени специфичности за собирање, обработка и чување на плунката во зависност од тоа што се испитува во неа.

Општи препораки за обработка и чување на плунката

Врз основа на бројни податоци од литературата и анализа на протоколите за процесирање на плунката за повеќенаменско испитување, се препорачува следново:

1. Стандардизирано собирање на плунката во епрувети кои се чуваат во мраз, со пасивно истекување на плунката или со методата на исплукување;
2. Мешање (Вортексирање) на собраниот примерок (2 минути, со максимална брзина). Оваа постапка, не се применува во случаи кога се испитува вискозноста на плунката, или пак кога е собрана плунката само од една плунковна жлезда. **Кратко мешање („краток вортекс“)** е поим со кој се подразбира кратко (не повеќе од 5-10 секунди) мешање на плунката во епруветата со некој друг реагенс или растворувач.
3. Центрифугирање на собраниот примерок на плунка (20 минути, на 3000 вртежи или пак, 5 минути на 10000 вртежи). Оваа постапка не се препорачува за плунка која се зема директно од изводниот канал на плунковната жлезда. Со центрифугирањето се исталажуваат, на дното на епруветата, одредени нечистотии (детритус) кои се присутни во плунката. На тој начин на површината се добива чист примерок од плунката, наречен супернатант, кој понатаму се анализира или замрзнува.
4. Собраните супернатанти се замрзнуваат на -20 степени целзиусови. Доколку е потребно чување на примероците подолго (неколку месеци), подобро е тие да се замрзнат на -80 степени.
5. Дозволено е само еднократно замрзнување и одмрзнување на примерокот. Поради тоа примероците, кои се чуваат треба да се замрзнуваат во мали епендорф-пакувања, со волумен од 0,5-1,5мл.
6. Се препорачува брзо одмрзнувањето на примерокот, со потопување на епрндорф примерокот во топла вода. Тоа е подобро отколку да се одмрзнува плунката, бавно на собна температура.

Потребно за изведување: сталак за епрувети, 3 пластична градуирана епрувета со конусно дно, 4 стаклени епрувети, инка, пастерова пипета, 6 мл нестимулирана/стимулирана плунка, Вортекс-апарат, центрифуга.

Изведување на вежбата:

Се колекционира 6 мл нестимулирана/стимулирана плунка со методата на плукање во градуирана пластична епрувета со конусно дно. Со помош на пастерова пипета се распределува содржината на собраната плунка (се пипетира по 3 мл) во други две градуирани пластични епрувети со конусно дно, кои се обележуваат со буквите А и В (пред буквите се обележува бројот на работното место на студентите, на пр. ако студентите се на работно место 2 се обележува 2А итн.).

1. **ВОРТЕКСИРАЊЕ:** Содржината од епруветата А се меша на Вортекс апарат, во траење од 60 секунди, со брзина 1. Содржината од епруветата В не се меша.

Забележета ја разликата во содржините на двете епрувети и евидентирајте што сте забележале, во “белата тетратка”, доколку ја поседувате .

2. **РАЗРЕДУВАЊЕ:** Содржината од епруветата А, се распределува во две стаклени епрувети (1мл во едната и 2 мл во другата) и се обележуваат со броевите 1 (епруветата во која има 1мл плунка) и 2(епруветата во која има 2мл плунка). Плунката во епруветата 1 се разредува 1:2, со дестилирана вода (во епруветата се додава 1мл на дестилирана вода). Потоа разредената содржина во епруветата 1 се подвргнува на “краток вортекс,.. Содржината од епруветата В исто така, се распределува во две стаклени епрувети (1мл во едната и 2 мл во другата) и се обележуваат со броевите 3 (епруветата во која има 1мл плунка) и 4(епруветата во која има 2мл плунка). Плунката во епруветата 3 се разредува 1:2, со дестилирана вода (во епруветата се додава 1мл на дестилирана вода). Потоа разредената содржина во епруветата 3 се подвргнува на “краток вортекс,..
3. Со досегашните постапки на **ОБРАБОТКА** на плунката, од плунката на еден испитаник се добиваат 4 различно процесирани примероци на плунка, и тоа:

епрувета 1	вортексирана и разредена плунка, 1: 2
епрувета 2	вортексирана и неразредена плунка
епрувета 3	невортексирана и разредена плунка, 1: 2
епрувета 4	невортексирана и неразредена плунка

Студентите можат да си ги запишат различните примероци на добиена плунка, во нивната „бела тетратка”

4. **ЦЕНТРИФУГИРАЊЕ:** Сите 4 примероци на плунка се центрифугираат на 4000 вртежи, во траење од 10 минути. При поставување на епруветите во центрифугата, да се внимава тие да бидат поставени на тој начин што ќе биде запазен балансот на центрифугата (да има подеднаков број на епрувети со приближно исто количество на течност на спротивните страни од центрифугата).

5. **ЗАМРЗНУВАЊЕ НА ПРИМЕРОК:** Со пастеровата пипета земете од 500 микролитри (0,5мл) до 1000 микролитреи (1мл) од супернатантот од првата и од четвртата епрувета и пренесете го во мали епендроф (1,5 мл) пластични епруветки. Обележете ги примероците со маркер, поставете ги на сталак за мали епендорф епрувети и замрзнете ги во фрижидер на -20 степени целзиусови.
6. **ОБЕЛЕЖУВАЊЕ НА ПРИМЕРОЦИТЕ:** Со оглед на тоа што овие примероци ќе бидат понатаму користени за анализа, потребно е прецизно бележење на малите пластични епруветки каде се замрзнува примерокот на плунка. Во еден фрижидер и во еден ист сталак за епендорф епруветки се чуваат примероците од сите студенти, обележувањето ќе се изведува на следниов начин:

X.Y.b

X-број на група (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

Y –број на работното место (1, 2, 3, 4 или 5)

b-број на примерокот

Пример: Студент од 5 група, на работно место 4, примерокот од епрувета 1, ќе биде обелжан на малата пластична епрувета за замрзнување на следниов начин: **5.4.1**, а при тоа студентот во својот практикум или во својата „бела тетратка“ ќе забележи за каков примерок станува збор (вотоксиран или не, центрифугиран или не, разреден итн.).

ВЕЖБА бр. 4: ДОКАЖУВАЊЕ НА ДЕЛУВАЊЕТО И ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА АКТИВНОСТА НА САЛИВАРНАТА АМИЛАЗА

Потребно за изведување: сталак за епрувети, 1 пластична градуирана епрувета со конусно дно, 12 стаклени епрувети, инка, пастерова пипета, 3мл профилтрирана плунка, 0,5% р-р на скроб, 0,2% р-р на скроб, луголов раствор, физиолошки р-р, Вортекс-апарат, водена бања, лабораториска чаша.

Лабораториска вежба бр. 1. Докажување на делувањето на саливарната амилаза.

Изведување на вежбата: се колекционира 3 мл профилтрирана мешана плунка во пластична градуирана епрувета со конусно дно, со методата на плукање. Се земаат 2 стаклени епрувети.

а. Во 1-та епрувета се налева 1мл 0,5% р-р на скроб;

б. Во 2-та епрувета се налева 1мл 0,5% р-р на скроб, се додава 1мл на профилтрирана мешана плунка ;

Епруветите се ставаат во водена бања, 15 минути и се контролира температурата да биде 38⁰С. По вадењето на епруветите од водена бања, во двете се додава по една капка на луголов р-р.

Што се случува во втората епрувета?

објаснувањето напишете го или во практикумот или во вашата „бела тетратка”

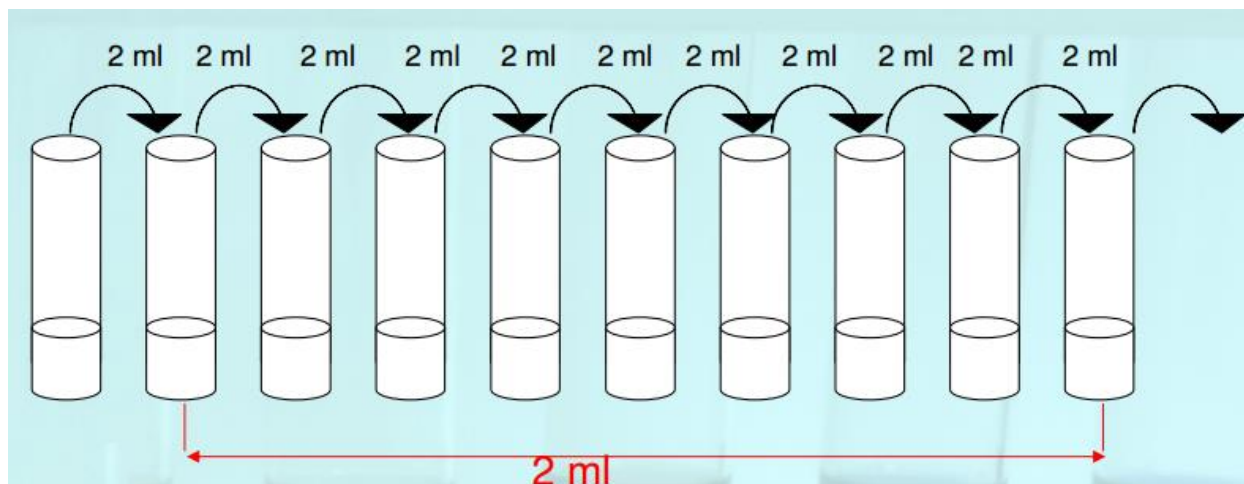
Лабораториска вежба бр. 2. Определување на активноста на саливарната амилаза според Wohlgemuth.

Изведување на вежбата: На сталак за епрувети се редат 10 чисти епрувети и во секоја се пипетира по 2 мл физиолошки раствор (освен во првата, во која се ставаат 4мл). Се зема 1 мл од филтрираната плунка од градуираната пластична епрувета со конусно дно и се додава во првата епрувета поставена на сталакот.

Содржината на епруветата се промешува (физиолошкиот р-р и плунката), на тој начин се добива пет пати разредена плунка. После тоа се пипетира 2 мл од содржината на првата епрувета со разредена плунка и се префрла во втората епрувета. Содржината и на втората епрувета се промешува и на тој начин се добива десет пати разредена плунка. Постапката

се повторува се до десеттата епрувета, од која на крај се отстранува содржина од 2 мл (прикажано на сликата).

Слика: Шематски приказ на разредувањето на плунката



Потребно е при ова разредување, пипетата со која се пипетира и се префрла содржината во друга епрувета, после секое префрлање да се испере со вода.

РАЗРЕДУВАЊЕ НА ПЛУНКАТА

Табела: Разредување на плунката во 10-те епрувети

епрувета	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
разредување	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560

Потоа во секоја од десетте епрувети се додава по 1мл 0,2% колоиден раствор на скроб. Содржината во секоја епрувета се промешува и се враќа во сталакот. Се термостатира 30 минути, во водена бања на 38° С. После термостатирањето, во секоја од епруветите се додава по 1 капка луголов р-р. Во епруветите, во кои скробот е разграден нема сина боја а во тие во кои не е разграден, бојата е сина. Помеѓу обоените и необоените содржини на епруветите, се појавува една содржина која со луголовиот р-р дава црвена боја. Црвената боја потекнува од реакцијата помеѓу разградниот продукт на скробот-еритродекстрин и луголовиот р-р. Во таа епрувета разредената плунка содржи една ензимска единица на α -амилаза според Wohlgemuth.



Ивановски К. Прирачник за практична настава по наставниот предмет Орална биохемија

Една ензимска единица на α -амилаза според Wohlgemuth е таква активност на ензимот, при што на температура од 38 степени за 30 минути се разградува 1 мг на скроб, односно 0,00055 мг на скроб за 1 секунда.

Ако $1W = 0,01nKat$, ако при изведување на вежбата во 5-та епрувета дошло до потполно разградување на скробот, тогаш ензимската активност на саливарната амилаза е $= 0.01 \cdot 32$ (во 5-та епрувета разредувањето на плунката е 1:32) $= 0,32nKat$.

Опреди ја ензимската активност во експериментот кој го изведуваш и изрази ја активноста во нанокатал и забележи го тоа во практикумот или во „белата тетратка“.

ВЕЖБА бр. 5: ВЛИЈАНИЕ НА РАЗЛИЧНИ ФАКТОРИ ВРЗ АКТИВНОСТА НА САЛИВАРНАТА АМИЛАЗА

Потребно за изведување: сталак за епрувети, 1 пластична градуирана епрувета со конусно дно, 6 стаклени епрувети, инка, пастерова пипета, 4-5 мл профилтрирана плунка, 0,5% р-р на скроб, луголов раствор, HCl (хлороводородна киселина), NaOH (натриум хидроксид), р-р Фелинг I, р-р Фелинг II, шпиртна ламба, дрвена штипка за епрувети, Вортекс-апарат, водена бања.

Лабораториска бежба 1. Докажување на влијанието на рН на средината врз активната на саливарната амилаза.

Изведување на вежбата: се колекционира 4-5 мл профилтрирана мешана плунка во пластична градуирана епрувета со конусно дно, со методата на плукање. Се земаат 3 стаклени епрувети.

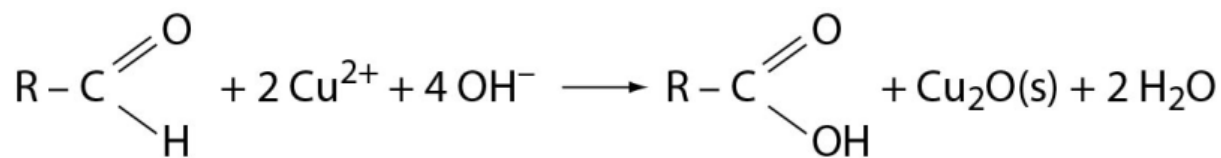
а. Во 1-та епрувета се налева 1мл 0,5%р-р на скроб и се додава 1мл на профилтрирана мешана плунка.

б. Во 2-та епрувета се налева 1 ml HCL, се додава 1мл 0,5%р-р на скроб, а потоа се додава 1мл на профилтрирана мешана плунка.

в. Во 3-та епрувета се налева 1 ml NaOH, се додава 1мл 0,5%р-р на скроб, а потоа се додава 1мл на профилтрирана мешана плунка.

Епруветите се ставаат во водена бања 15 минути и се контролира температурата да биде 38°C. После инкубацијата се изведува Фелинговата реакција во сите три епрувети. Фелинговата реакција се изведува со додавање на растворите Фелинг I и Фелинг II(по 1 мл) во епруветите.Епруветите се загреваат на шпиртна ламба, до вриење.

Позитивна фелингова реакција даваат сите моносахариди, а од дисахаридите малтоза и лактоза, односно сите јаглехидрати кои имаат слободни алдехидни и кето групи. Биохемиската основа на фелинговата проба е реакција помеѓу шеќерите и јоните на бакар, при што шеќерите се оксидираат а бакарот се редуцира, според следнава реакција:



При тоа се добива жолто-кафеав талог.

Протолкувајте ги резултатите, тука или во „белата тетратка“:

Лабораториска бевба 2. Докажување на влијанието на температурта врз активноста на саливарната амилаза

Изведување на вежбата: Се земаат 2 мл од филтрираната плунка од градуираната пластична епрувета со конусно дно, се делат на два дела, во две стаклени епрувети (епрувета II и епрувета III, спред долната табела). Содржината на едната епрувета (епрувета III, спред долната табела) се загрева, до вриење на пламеник (шпиртна ламба) или на решо.

Се зема уште една празна епрувета и се продолжува експериментот според следнава табела:

ЕПРУВЕТА	I	II	III
СКРОБ	1 мл	1мл	1мл
НЕПРОВРИЕНА ПЛУНКА		1мл	
ПРОВРИЕНА ПЛУНКА			1мл
ЛУГОЛОВ РАСТВОР	1мл	1мл	1мл

Сите три епрувети се ставаат во водена бања на инкубирање, 15 минути на 38°C.

Да се изведе фелинговата реакција на содржините во втората и третата епрувета. Во двете епрувети се додаваат по 2 мл на подготвен фелингов реагенс (1 мл фелинг I + 1мл фелинг II) и се загреваат до вриење.

Донесете заклучок што се случило во овие епрувети? *Запиши го заклучокот во продолжение или во „белата тетратка“.*

ВЕЖБА бр. 6: ИСТАЛОЖУВАЊЕ НА МУЦИН И MOLISCH-ОВ ТЕСТ

Потребно за изведување: сталак за епрувети, 1 пластична градуирана епрувета со конусно дно, 3 СТАКЛЕНИ епрувети, инка, пастерова пипета, 4 мл мешана плунка, заштитни маски (за студентот кој ќе пипетира концентрирана киселина), концентрирана оцетна киселина CH_3COOH , разредена база – NaOH , 20% раствор на α -нафтол во апсолутен етанол, H_2SO_4 - концентрирана, H_2O - дестилирана вода.

Изведување на вежбата: Се колекционираат 4 мл плунка, со методата на плукање во пластична градуирана епрувета со конусно дно. Мешаната плунка се дели во две епрувети (по 2 мл). Во првата епрувета се додава 1 мл концентрирана оцетна киселина, а во втората епрувета се додава 1 мл разредена база - NaOH . Епруветите, енергично но внимателно се промешуваат.

Што забележувате во епруветите? На што се должат добиените резултати?

Објаснувањето запишете го во продолжение или пак во „белата тетратка“.

ИЗВЕДЕТЕ ГО: (Molisch-ов тест):

Molischov-овиот тест, се користи за докажување на слободни или врзани јаглехидрати. Во оваа реакција служи за докажување на шеќерните резидуи на муциноот. Реакцијата се базира на дехидратација на молекулите на шеќерот со сулфурна киселина, при што од пентозите се добива фурфурал а од хексозите се добива 5-хидроксиметилфурфурал. Фурфуралот и неговите деривати со фенолите (тимол, α -нафтол, резорцин) создаваат обоени кондензациски продукти.

продолжете со изведување на вежбата:

Во третата епрувета се префрла исталожениот муцин од првата епрувета (се зема исталожениот муцин со Пастерова пипета од епруветата и се префрла во третата епрувета). Потоа, во третата епрувета изведете го Molisch-овиот тест.

Изведување на Molisch-ов тест: Исталожениот муцин се разредува со 1мл на дестилирана вода, се додаваат 2 капки алкохолен раствор на α -нафтол и се промешува. Внимателно се додава 1мл на сулфурна киселина (да лизга по ѕидот на епруветата, без мешање), до појава на раздвоени слоеви.

Што забележавте? На што се должи добиената реакција?

Објаснувањето запишете го во продолжение или пак во „белата тетратка“.

ВЕЖБА бр. 7: КВАЛИТАТИВНО ДОКАЖУВАЊЕ НА ПРОТЕИНИ ВО ПЛУНКА, ОБОЕНИ РЕАКЦИИ НА ПРОТЕИНИ

За докажување на протеини се користат повеќе реакции кои можат да се поделат во групи: обоени реакции и реакции на таложување.

Обоените реакции се базираат на докажување на пептидната врска или на докажување на одделни аминокиселини, односно докажување на функционални групи кои се присутни во одделни аминокиселини.

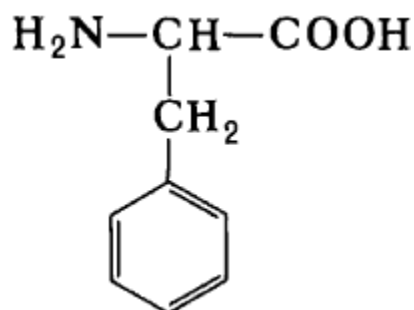
Најпознати обоени реакции за докажување на протеини се:

1. Биуретска реакција-докажување на пептидната врска
2. Ксантопrensка реакција-докажување на протеини кои во својата структура имаат ароматични аминокиселини (тирозин, фенилаланин, триптофан)
3. Реакција со олово (II) ацетат
4. Нинхидринска реакција-сите аминокиселини и протеини покажуваат позитивна нинхидринска реакција

На вежбите ќе бидат изведувани Биуретската и Ксантопrensката реакција.

Со Биуретската реакција, се докажува присуството на пептидни врски (при реакција на Cu^{2+} , во колоиден раствор, со N-јон од пептидната врска на пептидите и полипептидите, настанува комплексен spoj). Создадениот комплекс има светло виолетова боја со максимална апсорпција при бранова должина од 540nm.

Со Ксантопrensката реакција се докажуваат протеини кои во својата структура имаат ароматични аминокиселини (тирозин, фенилаланин, триптофан). Реакцијата се базира на нитрирање на ароматичниот прстен на аминокиселината, со помош на концентрирана азотна киселина.



Ова реакција е позитивна и кај цврсти, во вода нерастворливи протеини. Ако се капне на кожата или на ноктот капка на HNO_3 -конс. ќе настане жолто пребојување кое се губи дури порегенерацијата на кожата или на ноктот.



Ивановски К. Прирачник за практична настава по наставниот предмет Орална биохемија

Потребно за изведување: стапак за епрувети, 1 пластична градуирана епрувета со конусно дно, 2 стаклени епрувети, инка, пастерова пипета, 3 мл мешана плунка, NaOH-10%, CuSO₄-1%, HNO₃конс, шпиртна ламба, дрвена штипка за епрувети.

Лабораториска вежба бр. 1: Биуретка реакција за докажување на протеини.

Изведување на вежбата: Се колекционираат 3 мл нестимулирана и непрофилтрирана плунка, со методата на плукање во пластична градуирана епрувета со конусно дно. Во стаклена епрувета се налева 1мл од колекционираната плунка. Во епруветата се додава 1мл NaOH-10% а потоа 2 капки CuSO₄ 1%. Се промешува внимателно содржината. Епруветата се остава на собна температура, 30 минути а потоа се анализира добиеното обојување.

Објаснувањето запишете го во продолжение или пак во “белата тетратка,..”

Лабораториска вежба бр. 2: Ксантопренска реакција за докажување на протеини.

Изведување на вежбата: Во стаклена епрувета се налева 2 мл на нефилтрирана плунка, се додаваат неколку капки на HNO₃- концентрирана, а потоа растворот се загрева на пламеник. Се издвојува жолт талог. По ладењето на содржината во епруветата се додава 1 мл NaOH- 40%. Жолтата боја преминува во портокалова.

ВЕЖБА бр. 8: КВАНТИТАТИВНО ОДРЕДУВАЊЕ НА ПРОТЕИНИ ВО ПЛУНКА, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈА

Постојат повеќе методи за квантитативно определување на протеини. Изборот на методата зависи од видот, количината на примерокот кој се испитува како и од концентрацијата на протеините во испитуваниот примерок. Најчесто се користат методи кои се базираат на мерење на апсорбанцијата: Биуретска метода, Lowry-ева метода, Братфорд-ва метода. Постојат и други методи кои можат да се применат за определување на концентрацијата вкупните саиварни протеини, какови што се: ВСА-методата и методата која се користи за определување на вкупни протеини во цереброспиналниот иквор и во урината – Pirogallol red. Последната метода, која користи Pirogallol red реагенс, е погодна за определување на вкупни саливарни протеини затоа што ова метода е сензитивна и определува ниски концентрации на протеини во различни телесни течности, каква што е и пунктата.

Наведените методи се колориметриски или спектрофотометриски методи за мерење на концентрациите на протеините.

Квантитативна *UV/VIS* спектроскопија - *Lambert-Beer*-ов закон

Ултравioletовата/видливата (*UV/VIS*) спектроскопија има големо значење во квалитативната и квантитативната анализа на голем број соединенија.

Принцип:

При поминување на електромагнетно зрачење од *UV/VIS* спектралното подрачје низ раствор на одредени соединенија, интензитетот на пропуштеното зрачење се намалува како резултат на апсорпција на дел од зрачењето од страна на примерокот. При апсорпција на зрачењето доаѓа до побудување на електроните вклучени во молекулските врски и нивно преминување во повисоко енергетско ниво. Колку послабо се врзани електроните во врските на молекулата, толку е поголема брановата должина (а помала енергијата) на апсорбираното зрачење.

Квантитативната анализа во *UV/VIS* спектроскопијата се заснова на ***Lambert-Beer*-овиот закон**, кој гласи: *за монохроматско зрачење, апсорбанцијата е право пропорционална со должината на патот b на зрачењето низ медиумот (должина на оптичкиот пат) и со концентрацијата на испитуваната супстанција.*

$$A = \epsilon b c$$

A - апсорбанцијата,

b - должината на оптичкиот пат (ширината на киветата) во cm ,

c - концентрацијата на испитуваната супстанција во g/L и

ϵ - моларен апсорпционен коефициент (моларната апсорптивност):

апсорбанција на $1M$ раствор од испитуваната супстанција измерена во кивета од $1 cm$.

Со мерење на апсорбанција на раствор на испитуваниот примерок може да се определи концентрацијата на испитуваниот раствор на следниве начини:

1. *Со Метод на баждарен дијаграм* - се подготвува серија на стандардни раствори (најмалку пет) со позната концентрација на испитуваната супстанција, во концентрационо подрачје на линеарна зависност на концентрација во однос на апсорбанцијата. Се мерат апсорбанциите на стандардните раствори и на растворот со непозната концентрација и се конструира баждарен дијаграм од концентрациите во функција на апсорбанциите. Со обработка на баждарниот дијаграм со метод на најмали квадрати се добива регресионата равенка од која може да се пресмета концентрацијата на примерокот. Од измерената апсорбанција на растворот со непозната концентрација, од баждарниот дијаграм со екстраполација се одредува концентрацијата.
2. *Со Метод на определување преку споредба со стандардна супстанција* - овој метод може да се примени само кога концентрацијата на анализираниот и стандардниот раствор не се разликуваат многу и се наоѓаат во концентрационо подрачје на линеарна зависност на апсорпцијата од концентрацијата. Равенката за пресметување на концентрацијата се изведува од Lambert-Beer-овиот закон.

За стандардниот раствор: $A_s = \epsilon b c_s$

A_s - апсорбанција на стандардниот раствор

c_s - концентрација на стандарден раствор

За растворот со непозната концентрација: $A_x = \epsilon b c_x$

A_x - апсорбанција на испитуваниот раствор

c_x - концентрација на испитуваниот раствор

Производот ϵb е ист за двата раствора, затоа формулата за пресметување на концентрацијата на протеините во испитуваниот раствор ќе биде:

$$A_x/c_x = A_s/c_s, \text{ или } c_x = A_x \cdot c_s / A_s \quad \text{ИЛИ,} \quad \text{conc.на Анализа} = A_x / A_s \cdot c_s$$

Модифицирана Биуретска метода метода за определување на концентрација на вкупни саиварни протеини

Со Биуретската метода, како една од најприменуваните методи за определување на вкупни протеини, постојат одредени потешкотии за определување на протеини во плунка. Тоа е така поради малите концентрации на вкупните протеини во плунка (од 0,5-2,5 g/L). Лимитот на детекција на протеините со Биуретската метода е над 1g/L. Вообичаено при определување на вкупни протеини со оваа метода се зема по 20 микролитри од анализиранта течност, а заради малата концентрација на саливарни протеини, за нивно определување со Биуретската метода треба да се земе поголемо количество од анализиранта течност (пунктата). Тоа е предвидено со **Модифицирана Биуретска метода**.

Потребно за изведување:

- за 1-во работно место: сталак за епрувети, 7 стаклени епрувети, пипетори, кивети, спектрофотометар, физиолошки р-р, лабораториска чаша, готов Биуретски реагенс.
- за 2-ро, 3-то, 4-то и 5-то работно место: сталак за епрувети, 2 пластични градуирани епрувети со конусно дно, 2 стаклени епрувети, инки, пипетори, 2 мл мешана плунка, готов Биуретски реагенс.

напомена: Двајца студенти (студентите од работното место 1) ги подготвуваат слепата проба и стандардните раствори. Студентите од 2-ро, 3-то, 4-то и 5-то работно место, колекционираат плунка (секој студент донира плунка), вкупно осум анализи.

Изведување на вежбата: за студентите од 2-ро, 3-то, 4-то и 5-то работно место: Се колекционираат 2 мл нестимулирана и непрофилтрирана плунка, со методата на плукање во пластична градуирана епрувета со конусно дно. Плунката во епруветата вортексирајте ја 1 минута на брзина 1. Потоа поставете ја во центрифуга и центрифугирајте ја 20 минути на 4000 вртежи. За студентите од 1-во работно место: направете во една епрувета слепа проба и во следните шест епрувети различни стандардни раствори на BSA-протеини (0,2g/L; 0,4g/L; 0,7g/L; 1,0g/L; 2g/L и 3g/L). Во седните 8 епрувети ќе бидат анализите на плунките од студентите. Направете го тоа според следната шема:

епрувети:	1 (сл. проба)	2 (станд.1)	3 (станд.2)	4 (станд.3)	5 (станд.4)	6 (станд.5)	7 (станд.6)	8 анализи
3.0 g/L BSA (mL) :	–	0,1	0,2	0,35	0,5	1,0	1,5	–
примерок на протеини (mL):	–	–	–	–	–	–	–	0,5
физиолошки р-р: (mL)	1,5	1,4	1,3	1,15	1,0	0,5	-	1,5
концентрација g/L	0	0,2	0,4	0,7	1,0	2,0	3,0	?

Понатаму, во сите 15 епрувети (1 слепа проба, 6 стандарди и 8 анализи-плунка) додадете по 1,5мл на Биуретски реагенс, промешајте ги (краток вортекс) и инкубирајте ги на собна температура 30 минути. После тоа измерете ја апсорбанцата (на 545 nm) на сите примероци (на 6-те стандарди) а потоа и на примроците на плунката (анализа), наспроти слепата проба.

Определувањето на концентрацијата на вкупни саливарни протеини ќе го направите со *Метод на баждарен дијаграм.*

Задача за сите студенти: Конструирајте баждарен дијаграм од измерените вредности за апсорбанцијата во функција од концентрацијата. Концентрациите на стандардите внесете ги на апцисата, а вредностите на апсорбанциите внесете ги на координатата. Од измерената апсорбанција на растворот со непозната концентрација (во нашиов случај плунката), од баждарниот дијаграм со екстраполација одредете ја концентрацијата на протеини во плунката.



баждарен дијаграм

Во следната табела внесете ги вредностите на апсорбанциите на стандардите на анализираниите примероци и концентрациите на вкупни саливарни протеини на анализираниите примероци:

Апсорбанци		концентрации на вкупни саливарни протеини	
As-1		cs-1	0,2g/L
As-2		cs-2	0,4g/L
As-3		cs-3	0,7g/L
As-4		cs-4	1g/L
As-5		cs-5	2g/L
As-6		cs-6	3g/L
Ax-1		cx-1	
Ax-2		cx-2	
Ax-3		cx-3	
Ax-4		cx-4	
Ax-5		cx-5	
Ax-6		cx-6	
Ax-7		cx-7	
Ax-8		cx-8	

ВЕЖБА бр. 9: КВАНТИТАТИВНО ОДРЕДУВАЊЕ НА ЕЛЕКТРОЛИТИ ВО ПЛУНКА (КОЛОРИМЕТРИСКО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПЕН КАЛЦИУМ И НА ФОСФАТИ ВО ПЛУНКА)

1. Спектрофотометриско определување на вкупен саливарен калциум со o-cresolphthalein

Принцип на работа:

Калциумот од различни аналитички примероци реагира со o-cresolphthalein и создава црвено обоен комплекс кој може да се измери спектрофотометриски.

Потребно за изведување:

- за 2-ро работно место: сталак за епрувети, 1 пластична градуирана епрувета со конусно дно (за работен реагенс), 2 стаклени епрувети, пипетори, кивети, спектрофотометар, физиолошки р-р, лабораториска чаша, готов CALCIUM-CRESOLPHTHALEIN (реагенс А, реагенс В, стандард).
- за 1-ро, 3-то, 4-то и 5-то работно место: сталак за епрувети, 2 пластични градуирани епрувети со конусно дно, 2 стаклени епрувети, инки, пипетори, 2 мл мешана плунка, готов CALCIUM-CRESOLPHTHALEIN (реагенс А, реагенс В).

напомена: Двајца студенти (студентите од работното место 2) ги подготвуваат слепата проба и стандардниот раствор. Студентите од 1-во, 3-то, 4-то и 5-то работно место, колекционираат плунка (секој студент донира плунка), вкупно осум анализи.

Изведување на вежбата: за студентите од 1-во, 3-то, 4-то и 5-то работно место: Се колекционираат 2 мл нестимулирана и непрофилтрирана плунка, со методата на плукање во пластична градуирана епрувета со конусно дно. Плунката во епруветата вортексирајте ја 1 минута на брзина 1. Потоа поставете ја во центрифуга и центрифугирајте ја 20 минути на 4000 вртежи. За студентите од 2-ро работно место:

1. направете работен реагенс со мешање на 8мл од реагенсот А и 2мл на реагенсот В.
2. направете во една епрувета слепа проба и во една епрувета стандарден раствор на калциум (2,5 mmol/L).

Продолжете со следната процедура:

1. Пипетирајте во епруветите според препораките во табелата:

	слепа проба	стандард	анализа/и
калциум-стандард	-	13 μ L	-
примерок (плунка)	-	-	13 μ L
работен реагенс	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

2. Промешајте ги епруветите (краток вортекс) и оставете ги на собна температура да стојат 4 минути.
3. Измерете ја апсорбанцата А на стандардот и на примероците на 560 nm, наспроти слепата проба.

При определување на вкупен саливарен калциум ќе го примениме *Метод на определување преку споредба со стандардна супстанција бидејќи* концентрацијата на анализираниот и стандардниот раствор не се разликуваат многу и се наоѓаат во концентрационо подрачје на линеарна зависност на апсорпцијата. Поради тоа формулата со која ќе ја пресметаме концентрацијата на вкупниот саливарен калциум ќе биде следната:

$$\text{конс.на Анализа} = \frac{Ax}{As} \cdot cs$$

Во следната табела внесете ги вредностите на апсорбанциите на стандардот на анализираните примероци и концентрациите на вкупен саливарен калциум на анализираните примероци:

Апсорбанци		концентрации на вкупен саливарен калциум	
As		cs	2,5 mmol/L
Ax-1		cx-1	
Ax-2		cx-2	
Ax-3		cx-3	
Ax-4		cx-4	
Ax-5		cx-5	
Ax-6		cx-6	
Ax-7		cx-7	
Ax-8		cx-8	

2. Спектрофотометриско определување на саливарни фосфати со Phosphomolybdate

Принцип на работа:

Неорганскиот фосфор од различни аналитички примероци реагира со молибдат при кисела рН и создава комплекс - фосфомолибдат кој може да се измери спектрофотометриски.

Потребно за изведување:

- за 3-то работно место: сталак за епрувети, 1 пластична градуирана епрувета со конусно дно (за работен реагенс), 2 стаклени епрувети, пипетори, кивети, спектрофотометар, физиолошки р-р, лабораториска чаша, готов Phosphomolybdate (реагенс А, реагенс В, стандард).
- за 1-ро, 2-ро, 4-то и 5-то работно место: сталак за епрувети, 2 пластични градуирани епрувети со конусно дно, 2 стаклени епрувети, инки, пипетори, 2 мл мешана плунка, готов Phosphomolybdate (реагенс А, реагенс В).

напомена: Двајца студенти (студентите од работното место 3) ги подготвуваат слепата проба и стандардниот раствор. Студентите од 1-во, 2-ро, 4-то и 5-то работно место, колекционираат плунка (секој студент донира плунка), вкупно осум анализи.

Изведување на вежбата: за студентите од 1-во, 2-ро, 4-то и 5-то работно место: Се колекционираат 2 мл нестимулирана и непрофилтрирана плунка, со методата на плукање во пластична градуирана епрувета со конусно дно. Разредете ја плунката 1:2. Разредената плунка во епруветата вортексирајте ја 1 минута на брзина 1. Потоа поставете ја во центрифуга и центрифугирајте ја 20 минути на 4000 вртежи. За студентите од 3-то работно место:

1. направете работен реагенс со мешање на 7мл од реагенсот А и 3мл на реагенсот В.
2. направете во една епрувета слепа проба и во една епрувета стандарден раствор на калциум (1,61 mmol/L).

Продолжете со следната процедура:

1. Пипетирајте во епруветите според препораките во табелата:

	слепа проба	стандард	анализа/и
дестилирана вода	10 μ L	-	-
фосфати-стандард	-	10 μ L	-
примерок (плунка)	-	-	10 μ L
работен реагенс	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

2. Промешајте ги епруветите (краток вортекс) и оставете ги на собна температура да стојат 5 минути.
3. Измерете ја апсорбанцата А на стандардот и на примероците на 340 nm, наспроти слепата проба.

При определување на вкупни саливарни фосфати ќе го примениме *Метод на определување преку споредба со стандардна супстанција бидејќи* концентрацијата на анализираниот (разреден 1:2) и стандардниот раствор не се разликуваат многу и се наоѓаат во концентрационо подрачје на линеарна зависност на апсорпцијата. Поради тоа формулата со која ќе ја пресметаме концентрацијата на вкупниот саливарен калциум ќе биде следната:

$$\text{сопс.на Анализа} = A_x / A_s \cdot c_s \cdot \text{фактор на разредување}$$

-Во нашиот пример факторот на разредување е 2.

Во следната табела внесете ги вредностите на апсорбанциите на стандардот на анализираните примероци и концентрациите на вкупни саливарни фосфати на анализираните примероци:

Апсорбанци		концентрации на вкупни саливарни фосфати	
As		cs	1,61 mmol/L
Ax-1		cx-1	
Ax-2		cx-2	
Ax-3		cx-3	
Ax-4		cx-4	
Ax-5		cx-5	
Ax-6		cx-6	
Ax-7		cx-7	
Ax-8		cx-8	