

Ćwiczenie nr 5

Reaktywne formy tlenu

I. Oznaczenie ilościowe glutationu (GSH) metodą Ellmana

II. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej substancji metodą redukcji rodnika DPPH

WYKONANIE ĆWICZENIA:

I. Oznaczenie ilościowe glutationu (GSH) metodą Ellmana

1. Przygotowanie krzywej kalibracyjnej. Seryjne rozcieńczenia standardowego 1 mM roztworu glutationu służą do przygotowania krzywej wzorcowej.

Przygotuj próby w 8 probówkach szklanych zgodnie z poniższą tabelą. W 6 probówkach (próby 3-8) przygotuj rozcieńczenia standardowego 1 mM roztworu glutationu, a w dwóch probówkach (próby 1-2) przygotuj próby ślepe.

Próba	1 mM standard GSH (ml)	Bufor fosforanowy 0,2 M pH 8,2 (ml)	0,006 M DTNB (ml)
1 (ślepa)	0	2,7	0,3
2 (ślepa)	0	2,7	
3	0,03	2,67	
4	0,06	2,64	
5	0,09	2,61	
6	0,12	2,58	
7	0,15	2,55	
8	0,225	2,475	

2. Przygotowanie prób badanych.

Przygotuj w dwóch probówkach (próby X1 i X2) próby badane według poniższej tabeli.

Uwaga: Roztwór badany A stanowi część zestawu ćwiczeniowego. Roztwór badany B należy przygotować samodzielnie poprzez dwukrotne rozcieńczenie Roztworu badanego A za pomocą buforu fosforanowego.

Próba	Roztwór badany	Objętość roztworu badanego (A lub B) (ml)	Bufor fosforanowy 0,2 M pH 8,2 (ml)	0,006 M DTNB (ml)
X1	A	0,1	2,6	0,3
X2	B			

1. Dokonaj pomiaru absorbancji wszystkich przygotowanych prób (próby 3-8 oraz próby A i B) w obecności próby ślepej, przy długości fali $\lambda=412$ nm.
2. Oblicz stężenie GSH w próbach 3-8, a uzyskane wyniki umieść w sprawozdaniu.
3. Zanotuj w sprawozdaniu wyniki pomiaru absorbancji poszczególnych prób oraz równanie sporządzonej krzywej kalibracyjnej.
4. Na podstawie odczytanej absorbancji i sporządzonej krzywej kalibracyjnej określ stężenie glutationu w badanych próbkach A i B, a wynik umieść w sprawozdaniu.

II. Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej substancji metodą redukcji rodnika DPPH

1. Z otrzymanych 5 mM roztworów substancji badanych (1-3), które znajdują się w probówkach typu eppendorf przygotuj roztwory 1 mM według schematu przedstawionego w poniższej tabeli.

Próba	Substancja badana	Rozpuszczalnik	Objętość roztworu substancji badanej (ml)	Objętość rozpuszczalnika (ml)
1	Kwas galusowy	Woda destylowana	0,2	0,8
2	Kwas askorbinowy	Woda destylowana	0,2	0,8
3	α – tokoferol	DMSO	0,2	0,8

2. 0,3 mM etanolowy roztwór DPPH oraz przygotowane roztwory nanieś na płytkę 96-dołkową według poniższego schematu, pamiętając o dokładnym wymieszaniu zawartości poszczególnych dołków. Każdą próbę wykonaj w trzykrotnym powtórzeniu.

- w 15 dołkach (3 kolumny, 5 rzędów) umieść 95 μ l roztworu DPPH
- do każdego dołka dodaj 5 μ l odpowiedniego roztworu:

I rząd: H₂O

II rząd: DMSO

III rząd: kwas galusowy

IV rząd: kwas askorbinowy

V rząd: α -tokoferol

3. Płytkę zamknij i inkubuj w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę.
4. Po inkubacji odczytaj absorbancję roztworów znajdujących się w poszczególnych dołkach płytki przy długości fali 517 nm.
5. Oblicz całkowitą zdolność antyoksydacyjną badanych substancji do przeciwdziałania reakcji utleniania korzystając z poniższego wzoru:

$$\% \text{ inhibicji} = 100 (A_0 - A_S) / A_0$$

gdzie:

A_0 – absorbancja próby kontrolnej

A_S – absorbancja próby badanej

6. Oblicz, jakie było stężenie badanych substancji w dołkach (wynik podaj w μM)