

jména:	
obor:	datum provedení:

**přílohy protokolu:** graf: závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, graf: závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu - linearizace podle Lineweavera a Burka, graf: závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu - linearizace podle Hanese, graf: závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu - linearizace podle Eadieho a Hofstee, graf: závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu - linearizace podle Eadieho a Scatcharda, graf: závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci inhibitoru – vyhodnocení podle Dixona

## OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Trypsinová reakce, princip měření trypsinové aktivity s použitím umělého chromogenního substrátu. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, rovnice Michaelise a Mentenové, Michaelisova konstanta, limitní (maximální) rychlost reakce. Linearizace rovnice Michaelise a Mentenové. Kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní inhibice enzymu. Lambertův-Beerův zákon. Chemické výpočty.

**Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).**

**Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen část A.**

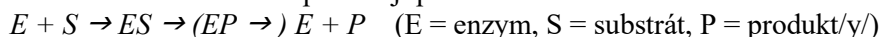
**Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): jen část A.**

## PRINCIP ÚLOHY

### A. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, stanovení $K_M$ a $V_{lim}$

Rychlost enzymových reakcí je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí, množství enzymu v reakční směsi, přítomnosti efektorů (modifikátorů) a také na koncentraci substrátů.

Jednosubstrátové reakce probíhají podle obecného schématu:



Při konstantní koncentraci enzymu je počáteční rychlost jednosubstrátové enzymové reakce  $v_0$  ( $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ ) závislá na koncentraci substrátu  $[S]$  ( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) podle vztahu:

$$v_0 [\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}] = (V_{lim} \cdot [S]) / (K_M + [S]) \quad (\text{rovnice Michaelise a Mentenové})$$

kde  $V_{lim}$  [ $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ ] je **limitní (maximální) rychlost reakce** a  $K_M$  [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] je **Michaelisova konstanta**.  $K_M$  je základní kinetickou konstantou, která je za určitých podmínek (pH, teplota, složení reakční směsi atd.) typická pro každou dvojici enzym – substrát. Při koncentraci substrátu  $[S] = K_M$  je reakční rychlost rovna polovině limitní (maximální) rychlosti:

$$v_0 = (V_{lim}[S]) / (K_M + [S]) \xrightarrow{K_M=[S]} v_0 = V_{lim}[S] / 2[S] = V_{lim} / 2$$

Enzym s malou hodnotou  $K_M$  tedy dosahuje maximálního katalytického účinku při nízkých koncentracích substrátu.

Michaelisova konstanta může být rovněž vyjádřena jako:  $K_M = k_{-1} / k_1 + k_2 / k_1 = K_S + k_2 / k_1$

$K_S$  je v tomto případě disociační konstanta Michaelisova komplexu a  $K_M$  tedy může být také měřítkem afinity enzymu k substrátu za předpokladu že  $k_2 / k_1$  je malé ve srovnání s  $K_S$ .

Závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu (při konstantní koncentraci enzymu) má hyperbolický průběh (rovnoosá /pravoúhlá/ hyperbola s posunutým začátkem o souřadnicích  $[V_{\text{lim}}; -K_M]$ ) a sestává ze dvou částí rozdělených hodnotou  $K_M$ :

$$v_0 = (V_{\text{lim}} \cdot [S]) / (K_M + [S])$$

$[S] \ll K_M \Rightarrow v_0 \approx V_{\text{lim}} \cdot [S] / K_M = \text{konst.} \cdot [S]$   
 $[S] \gg K_M \Rightarrow v_0 \approx V_{\text{lim}} \cdot [S] / [S] = V_{\text{lim}}$

- při nízkých koncentracích substrátu je jen malá část molekul enzymu vázána do komplexu ES, pro koncentraci volného enzymu tedy platí:  $[E] \gg [ES]$ , rychlost reakce je úměrná koncentraci substrátu  $[S]$  a reakce probíhá podle kinetiky reakce prvního řádu.

V praxi se podmínek nadbytku enzymu v reakční směsi využívá pro stanovení koncentrace substrátu (viz úloha 9).

- při vysokých koncentracích substrátu je naopak všechen enzym vázán do komplexu ES, takže platí  $[E] \ll [ES]$ , reakce se vzhledem k substrátu stává reakcí nultého řádu, je dosaženo limitní (mezní, maximální) rychlosti reakce  $V_{\text{lim}}$ , která už se zvyšující se koncentrací substrátu dále nestoupá, neboť pro další substrát už není k dispozici volný enzym (nasycení /saturace/ enzymu substrátem).

Množství vznikajících produktů se při dostatečně vysoké koncentraci substrátu mění s časem lineárně a směrnice přímky popisující závislost  $dP/dt$  je ekvivalentní koncentraci enzymu (aktivitě enzymu). V praxi probíhá za podmínek nadbytku substrátu v reakční směsi (nepřímé – kinetické) měření aktivity enzymu (viz úloha 7):  $V_{\text{lim}}$  je při nasycení enzymu substrátem úměrná koncentraci enzymu. Nejde tedy (na rozdíl od Michaelisovy konstanty, která na koncentraci enzymu nezávisí) o veličinu charakteristickou pro studovaný systém enzym-substrát.

- při koncentracích substrátu blízkých hodnotě  $K_M$  probíhá reakce podle kinetiky reakce smíšeného řádu.

$K_M$  je (na rozdíl od  $V_{\text{lim}}$ ) nezávislá na koncentraci enzymu, závisí však na prostředí, v němž probíhá enzymová reakce (pH, teplota, přítomnost efektorů).

Praktický význam zjištění hodnoty  $K_M$  je následující:

- hodnoty  $K_M$  určují přibližně vnitrobuněčné koncentrace substrátů enzymů intermediárního metabolismu,
- porovnání hodnot  $K_M$  je obvykle prvním krokem při zkoumání totožnosti enzymů izolovaných z různých organismů, tkání nebo subcelulárních frakcí buňky,
- u enzymů se širší substrátovou specifiitou se považuje za fyziologický ten substrát, který má nejnižší hodnotu  $K_M$ ,
- znalost hodnoty  $K_M$  má bezprostřední význam pro optimalizaci podmínek stanovení aktivity enzymů v biologickém materiálu, při použití enzymů k analytickým účelům apod. Pro správné stanovení aktivity enzymu je nutné, aby byla koncentrace substrátu v reakční směsi alespoň desetinásobkem Michaelisovy konstanty.

Nedostatkem rovnice Michaelise a Mentenové je, že popisuje pouze počáteční rychlost reakce (pro  $t = 0$ ), kdy je složení reakční směsi konstantní (koncentrace substrátu se neliší od výchozí, známé  $[S]$  a koncentrace produktu v reakční směsi je nulová). Z toho důvodu je nutno provádět kinetická měření v pokud možno co nejkratším čase, obecně za podmínek, při nichž se na produkt nepřeměnilo více než 10 % substrátu vneseného do reakční směsi na počátku reakce, anebo měřit rychlost reakce v různých časových intervalech a stanovit ve všech případech počáteční rychlost reakce extrapolačními metodami (viz úloha 7).

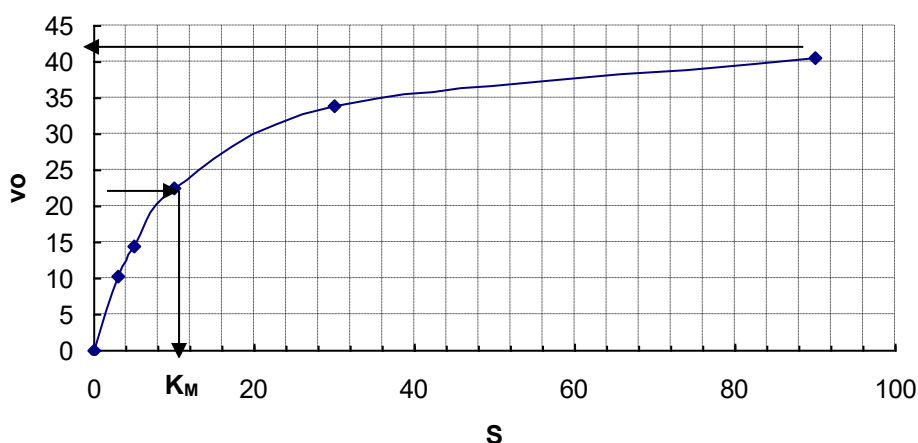
Nejednodušší způsob grafického zjištění hodnot  $K_M$  a  $V_{\text{lim}}$  spočívá v sestavení závislosti počáteční rychlosti enzymové reakce  $v_0$  na koncentraci substrátu  $[S]$ . Odečtení  $V_{\text{lim}}$  a  $K_M$  z nelineární závislosti  $v_0$  na  $[S]$  je však nepřesné, a proto se prakticky nepoužívá. Rovnici Michaelise a Mentenové lze několika způsoby lineárně transformovat na rovnice typu  $y = ax + b$  (obecná rovnice přímky), kde  $x$  je nezávisle proměnná,  $y$  je závisle proměnná,  $a$  je směrnice přímky a  $b$  je úsek na ose  $y$ :

<i>linearizace podle</i>	linearizovaný tvar rovnice Michaelise a Mentenové	$\underline{x}$	$\underline{y}$	výnos $\underline{y}$ proti $\underline{x}$	$\underline{a}$ (směrnice přímky)	$\underline{b}$ (úsek na ose $y$ )
<b>Lineweaver - Burk</b>	$1/v_0 = K_M/V_{lim} \cdot 1/[S] + 1/V_{lim}$	$1/[S]$	$1/v_0$	$1/v_0$ proti $1/[S]$	$K_M/V_{lim}$	$1/V_{lim}$
<b>Hanes</b>	$[S] / v_0 = (1/V_{lim}) \cdot [S] + K_M/V_{lim}$	$[S]$	$[S]/v_0$	$[S] / v_0$ proti $[S]$	$1/V_{lim}$	$K_M/V_{lim}$
<b>Eadie - Hofstee</b>	$v_0 = -K_M \cdot v_0/[S] + V_{lim}$	$v_0/[S]$	$v_0$	$v_0$ proti $v_0/[S]$	$-K_M$	$V_{lim}$
<b>Eadie-Scatchard</b>	$v_0/[S] = -v_0/K_M + V_{lim}/K_M$	$v_0$	$v_0/[S]$	$v_0/[S]$ proti $v_0$	$-1/K_M$	$V_{lim}/K_M$

Lineární závislosti umožňují přesněji odečítat hodnoty  $K_M$  a  $V_{lim}$  ze směrnice přímky anebo z úseku na ose  $y$  (případně z průsečíku přímky s osou  $x$ ). I když se v současnosti používá nelineární regrese kinetických dat s využitím speciálního počítačového software, pro běžné účely je tento způsob vyhodnocení kinetických dat dostačující.

V této úloze budou kinetické parametry enzymové reakce stanoveny jen přibližně – měření reakčních rychlostí bude prováděno pouze v jediném časovém intervalu, bez extrapolace k nulovému času.

### Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu



odhad hodnoty  
Michaelisovy  
konstanty:

$V_{lim} = 42$  (nkat)  
 $V_{lim}/2 = 21$  (nkat)  
 $K_M = 11$  (mmol/l)

## B. Inhibice enzymové reakce

Katalytickou účinnost enzymů ovlivňuje řada látek – efektorů (modifikátorů). Zvyšují-li aktivitu enzymu, jedná se o **pozitivní efekty** – **aktivátory**; snižují-li aktivitu enzymu, jedná se o **negativní efekty** - **inhibitory**. Efektory mění aktivitu enzymu tím, že se vážou buď přímo v aktivním centru enzymu, nebo mimo ně (allosterické efekty).

Podle možnosti obnovit původní aktivitu enzymu lze rozlišit *vratnou (reverzibilní)* a *nevratnou (ireverzibilní)* inhibici. Reverzibilní inhibitor lze z enzymu odstranit (např. dialýzou) a obnovit tak enzymovou aktivitu. Při ireverzibilní inhibici se již nedá aktivita enzymu žádným způsobem obnovit; spíše, než o inhibici se tedy jedná o *inaktivaci* enzymu. Kinetika je ireverzibilní inhibice (inaktivace) jednoduchá: postupnými přidávkami inhibitoru se rozsah inhibice stále zvětšuje, až je všechen enzym vázán do komplexu enzym-inhibitor a tím inaktivován.

Reverzibilní inhibitory působí nejčastěji následujícími mechanismy: buďto vyvolávají změnu struktury molekuly enzymu a následkem toho pak enzym ztrácí schopnost katalytické účinnosti, anebo konkurují substrátu při vazbě na aktivní centrum a tím snižují rychlost přeměny substrátu.

Z hlediska mechanismu působení na enzym existují čtyři základní typy (zpravidla reverzibilní) inhibice, navzájem dobře rozeznatelné kinetickým měřením – srovnáním velikosti Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti reakce naměřených bez inhibitoru ( $K_M$ ,  $V_{lim}$ ) a v jeho přítomnosti ( $K_M'$ ,  $V_{lim}'$ ):

- **kompetitivní inhibice** – inhibitor neovlivňuje limitní rychlost reakce ( $V_{lim}' = V_{lim}$ ), ale zvyšuje Michaelisovu konstantu ( $K_M' > K_M$ ),
- **nekompetitivní inhibice** - inhibitor snižuje limitní rychlost reakce ( $V_{lim}' < V_{lim}$ ), Michaelisova konstanta se však nemění ( $K_M' = K_M$ ),

- **akompetitivní inhibice – inhibitor** snižuje limitní rychlost reakce i Michaelisovu konstantu, ale tak, že se nemění jejich poměr ( $K_M'/K_M = V_{lim}'/V_{lim}$ ),
- **smíšená inhibice** - inhibitor mění limitní rychlost reakce, Michaelisovu konstantu i jejich poměr ( $K_M'/K_M \neq V_{lim}'/V_{lim}$ ).

*Kompetitivní inhibitory* mají strukturu (celé molekuly nebo její části uplatňující se ve vazbě na enzym) natolik podobnou substrátu, že je enzym nerozezná a tvoří s nimi namísto komplexu enzym-substrát inaktivní komplex enzym-inhibitor, který se nepřeměňuje na produkt (inhibitor není schopen se přeměnit na produkt). Tvorba komplexu enzym-kompetitivní inhibitor je vratná. Je-li současně přítomen substrát, soutěží s inhibitorem o aktivní místo enzymu. Rozsah inhibice pak závisí na poměru koncentrací obou látek a na poměru jejich afinit k enzymu. Účinek inhibitoru lze zcela odstranit nadbytkem substrátu. K dosažení limitní rychlosti reakce v přítomnosti inhibitoru je třeba vyšší koncentrace substrátu než v prostředí bez inhibitoru. Kompetitivní inhibice je důsledkem neabsolutní specifity enzymu.

*Nekompetitivní inhibitory* v typickém případě neovlivňují vazbu substrátu na enzym, ale snižují rychlost přeměny substrátu na produkt. Někdy se však mohou ireverzibilně vázat do aktivního centra enzymu, případně poblíž aktivního centra, a v tomto druhém případě stericky bránit přístupu substrátu k aktivnímu centru enzymu. Jejich účinek je nezávislý na koncentraci substrátu (nesoutěží se substrátem o vazebné místo) a nelze jej odstranit zvýšením koncentrace substrátu. Rozsah inhibice závisí pouze na koncentraci inhibitoru a jeho afinitě k enzymu. Jestliže se vážou zcela mimo aktivní centrum enzymu, je mechanismus jejich účinku zpravidla založen na allosterickém efektu: inhibitory mění konformaci enzymu z aktivní na inaktivní prostřednictvím šířící se změny struktury, kterou vyvolávají vazbou na molekulu enzymu. Ve výsledku je situace podobná, jako kdyby byla v reakční směsi snížena koncentrace enzymu, který je k dispozici pro katalýzu.

*Akompetitivní inhibitory* se mohou vázat na enzym, teprve když vazba substrátu vhodně pozmění konformaci enzymu. Nevážou se tedy na volný enzym, ale na komplex enzym-substrát, přičemž zabrání přeměně substrátu na produkt. Akompetitivní inhibici nelze zrušit nadbytkem substrátu. Je typická pro vícesubstrátové reakce (proto nebude dále podrobněji popisována).

Důležitou skupinou přirozených inhibitorů tvoří inhibitory polypeptidové povahy, které inaktivují některé proteolytické enzymy. Patří sem i skupina inhibitorů trypsinu, zahrnující např. trypsinový inhibitor z vaječného bílku (ovomukoid) nebo trypsinový inhibitor ze sójových semen.

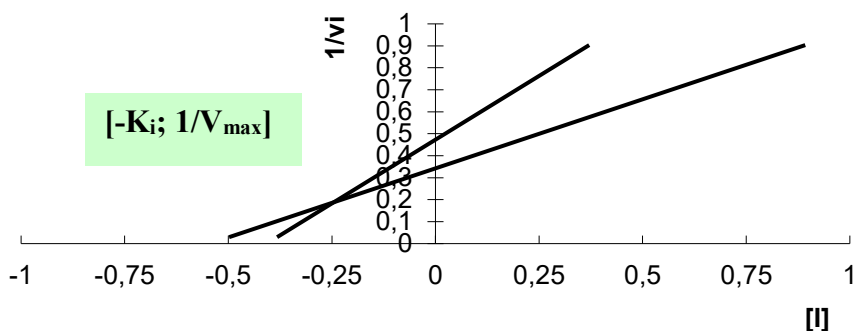
Účinek inhibitoru kvantitativně charakterizuje **inhibiční konstanta  $K_i$** , která udává koncentraci inhibitoru  $[I]$ , při níž je dosaženo právě 50 % inhibice enzymu (50 % enzymu přítomného v reakční směsi je vázáno do komplexu enzym-inhibitor).

Zjištění  $K_i$  přímou metodou podle Dixona, která zároveň umožňuje usuzovat na typ inhibice, spočívá v měření závislosti *počáteční rychlosti reakce na koncentraci inhibitoru* při konstantní koncentraci substrátu v reakční směsi (měření je nutno provést při alespoň dvou konstantních koncentracích substrátu). Nevyžaduje přitom znalost kinetických parametrů neinhibované reakce. Grafické vyhodnocení je provedeno výnosem hodnot  $1/v_0$  proti  $[I]$ .

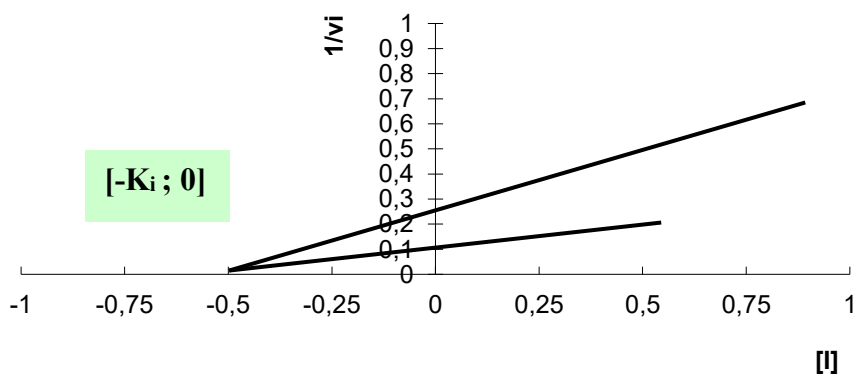
Při *kompetitivní inhibici* se přímky závislosti  $1/v_0$  proti  $[I]$  naměřené při dvou různých koncentracích substrátu protínají ve 4. kvadrantu, jejich průsečík má souřadnice  $[-K_i; 1/V_{lim}]$ .

Při *nekompetitivní inhibici* se přímky závislosti  $1/v_0$  proti  $[I]$  naměřené při dvou různých koncentracích substrátu protínají na ose  $x$ , jejich průsečík má souřadnice  $[-K_i; 0]$ .

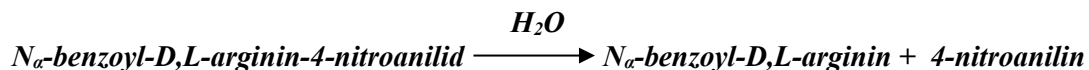
Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci kompetitivního inhibitoru - vyhodnocení podle Dixona



Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci nekompetitivního inhibitoru - vyhodnocení podle Dixona



Jako přirozené substráty trypsinu bývají používány běžné bílkoviny (kasein, želatina, hemoglobin, albumin) a jako umělý chromogenní substrát, kromě jiných také  $N_{\alpha}$ -benzoyl-D,L-arginin-4-nitroanilid ( $N_{\alpha}$ -benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid, BAPNA), který je trypsinem štěpen za vzniku  $N_{\alpha}$ -benzoyl-D,L-argininu a 4-nitroanilinu (PNA):



V kyselém prostředí absorbuje 4-nitroanilin viditelné záření s maximem v okolí vlnové délky 405 nm ( $\epsilon_{PNA} = 9,62 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) a jeho množství vzniklé enzymovou reakcí lze stanovit fotometricky. Okyselení vzorku zároveň ukončuje enzymovou reakci.

## PRAKTICKÁ ČÁST A. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, stanovení $K_M$ a $V_{lim}$

### Materiál a vybavení:

preparát trypsinu (viz úloha č. 8)  
40 mmol.l<sup>-1</sup> roztok BAPNA v dimethylsulfoxidu  
60 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-Cl pufr s přidavkem 30 mmol.l<sup>-1</sup>chloridu vápenatého, pH 8,2  
dimethylsulfoxid (DMSO)  
30 % kyselina octová  
*krátké zkumavky, pipety, dávkovače, vortex, termostat, stopky, fotometr*

### Postup:

Do 21 zkumavek (paralelní trojice) napipetujte 1 ml Tris-Cl pufru a 0,75 ml vody. Dále pipetujte roztok BAPNA a DMSO podle rozpisu v tabulce níže:

zk. č.	objem roztoku BAPNA [μl]	objem DMSO [μl]	c (BAPNA) [mmol.l <sup>-1</sup> ]	start reakce - čas na stopkách	konec reakce - čas na stopkách	A <sub>405</sub>	ØA <sub>405</sub>	c (PNA) [mmol.l <sup>-1</sup> ]	n PNA [μmol] na ml reakční směsi	rychlost [μmol.min <sup>-1</sup> ] na ml reakční směsi
1	20	180		0''	5'					
2	20	180		20''	5'20''					
3	20	180		-----	-----	0,000				
4	40	160		40''	5'40''					
5	40	160		1'	6'					
6	40	160		-----	-----	0,000				
7	60	140		1'20''	6'20''					
8	60	140		1'40''	6'40''					
9	60	140		-----	-----	0,000				
10	80	120		2'	7'					
11	80	120		2'20''	7'20''					
12	80	120		-----	-----	0,000				
13	120	80		2'40''	7'40''					
14	120	80		3'	8'					
15	120	80		-----	-----	0,000				
16	160	40		3'20''	8'20''					
17	160	40		3'40''	8'40''					
18	160	40		-----	-----	0,000				
19	200	0,0		4'	9'					
20	200	0,0		4'20''	9'20''					
21	200	0,0		-----	-----	0,000				

Do zkumavek č. 3, 6, 9, 12, 15, 18 a 21 připipetujte 0,5 ml kyseliny octové a 50 μl vody, zkumavky ponechejte stranou – jejich obsah bude sloužit jako kontrolní vzorky.

Ostatní zkumavky inkubujte v termostatu temperovaném na teplotu 37 °C po dobu 10 minut. Poté startujte enzymovou reakci přidavkem 50 μl roztoku trypsinu v intervalech 20 sekund, kdy po přidavku

trypsinu reakční směs promíchejte na vortexu. Následně přesně po 5 minutách jednotlivé reakce zastavte přidáním 0,5 ml roztoku kyseliny octové, kdy vzorek opět důkladně promíchejte na vortexu.

**Během enzymové reakce zůstávají zkumavky s reakční směsí v termostatu.**

Změřte absorbanci všech vzorků při vlnové délce 405 nm proti příslušnému kontrolnímu vzorku (zkumavky č. 3, 6, 9, 12, 15, 18 a 21).

**Vyhodnocení:**

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou experimentálními ( $A_{405}$ ) a vypočtenými údaji ( $\epsilon_{\text{PNA}} = 9,62 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Do grafu vynesete závislost *reakční rychlosti na koncentraci substrátu*. Z grafu přibližně odhadněte velikost  $K_M$  (odhad v grafu znázorněte).

Experimentální výsledky dále graficky zpracujte pomocí linearizovaných výnosů podle autorů

- a) Lineweaver - Burk ( $1/v_0$  proti  $1/c_{\text{BAPNA}}$ )
- b) Hanes ( $c_{\text{BAPNA}}/v_0$  proti  $c_{\text{BAPNA}}$ )
- c) Eadie - Hofstee ( $v_0$  proti  $v_0/c_{\text{BAPNA}}$ )
- d) Eadie - Scatchard ( $v_0/c_{\text{BAPNA}}$  proti  $v_0$ )

Vypočtené údaje nejprve přehledně shrňte do tabulky:

c (BAPNA) [mmol.l <sup>-1</sup> ]	Lineweaver - Burk		Hanes		Eadie - Hofstee		Eadie - Scatchard	
	1/v <sub>0</sub>	1/c <sub>BAPNA</sub>	c <sub>BAPNA</sub> /v <sub>0</sub>	c <sub>BAPNA</sub>	v <sub>0</sub>	v <sub>0</sub> /c <sub>BAPNA</sub>	v <sub>0</sub> /c <sub>BAPNA</sub>	v <sub>0</sub>

Z linearizovaných grafů odečtěte hodnoty výrazů, z nichž lze vypočítat  $K_M$  a  $V_{\text{lim}}$ .

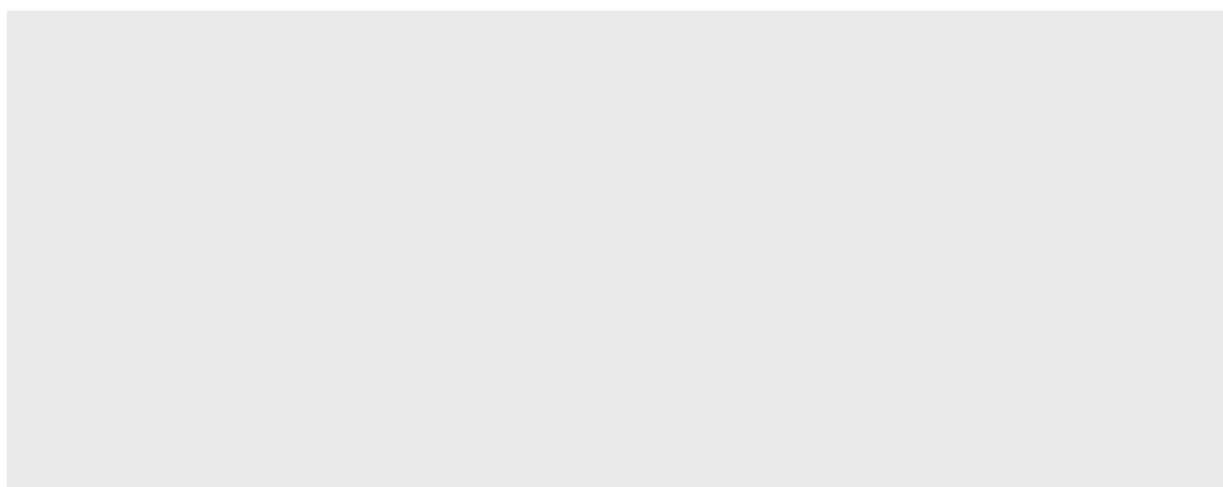
	Lineweaver - Burk	Hanes	Eadie - Hofstee	Eadie - Scatchard
směrnice přímky				
úsek na ose y				
souřadnice průsečíku přímky s osou x				

Obě veličiny vypočtěte.



Srovnajte hodnoty  $K_M$  a  $V_{lim}$  zjištěné různými způsoby:

<i>grafické vynesení podle</i>	$K_M$ [mmol.l <sup>-1</sup> ]	$V_{lim}$ [μmol.min <sup>-1</sup> ]	$V_{lim}$ [nkat]	$K_M$ [mmol.l <sup>-1</sup> ] nebo $V_{lim}$ [μmol.min <sup>-1</sup> ] zjištěná ze souřadnic průsečíku přímky a osy x
Michaelis - Mentenová				----
Lineweaver – Burk				
Hanes				
Eadie - Hofstee				----
Eadie – Scatchard				



## PRAKTICKÁ ČÁST B. Inhibice enzymové reakce

### Materiál a vybavení:

preparát trypsinu (viz úloha č. 8)  
40 mmol.l<sup>-1</sup> roztok BAPNA v dimethylsulfoxidu  
60 mmol.l<sup>-1</sup> Tris-Cl pufr s přidavkem 30 mmol.l<sup>-1</sup> chloridu vápenatého, pH 8,2  
dimethylsulfoxid (DMSO)  
30 % kyselina octová  
20 mg.l<sup>-1</sup> TISB  
*krátké zkumavky, pipety, dávkovače, vortex, termostat, stopky, fotometr*

### Postup:

Do 24 zkumavek (paralelní dvojice) pipetujte 1 ml Tris-Cl pufru. Dále pipetujte roztok BAPNA, inhibitoru, DMSO a vody podle rozpisu v tabulce níže:

zk. č.	objem roztoku BAPNA [μl]	objem roztoku inhibitoru [μl]	objem DMSO [μl]	objem vody [μl]	start reakce - čas na stopkách	konec reakce - čas na stopkách	A <sub>405</sub>	Ø A <sub>405</sub>	c (PNA) [mmol.l <sup>-1</sup> ]	n PNA [μmol] na ml reakční směsi	rychlost [μmol.min <sup>-1</sup> ] na ml reakční směsi
1	25	0	25	900	20''	10'20''					
2	25	0	25	900	40''	10'40''					
3	25	50	25	850	1'	11'					
4	25	50	25	850	1'20''	11'20''					
5	25	75	25	825	1'40''	11'40''					
6	25	75	25	825	2'	12'					
7	25	100	25	800	2'20''	12'20''					
8	25	100	25	800	2'40''	12'40''					
9	25	125	25	775	3'	13'					
10	25	125	25	775	3'20''	13'20''					
11	25	150	25	750	3'40''	13'40''					
12	25	150	25	750	4'	14'					
13	50	0	0	900	20''	10'20''					
14	50	0	0	900	40''	10'40''					
15	50	50	0	850	1'	11'					
16	50	50	0	850	1'20''	11'20''					
17	50	75	0	825	1'40''	11'40''					
18	50	75	0	825	2'	12'					
19	50	100	0	800	2'20''	12'20''					
20	50	100	0	800	2'40''	12'40''					
21	50	125	0	775	3'	13'					
22	50	125	0	775	3'20''	13'20''					
23	50	150	0	750	3'40''	13'40''					
24	50	150	0	750	4'	14'					

Zkumavky rozdělte na dvě skupiny (1-12 a 13-24) a v každé skupině provedte enzymovou reakci zvlášť. Zkumavky inkubujte v termostatu temperovaném na teplotu 37 °C po dobu 10 minut. Poté startujte enzymovou reakci přidavkem 50 μl roztoku trypsinu v intervalech 20 sekund, kdy po přidavku trypsinu reakční směs promíchejte na vortexu a vraťte zkumavky do termostatu na teplotu 37 °C. Následně přesně po 10 minutách jednotlivé reakce zastavte přidavkem 0,5 ml roztoku kyseliny octové, kdy vzorek opět důkladně promíchejte na vortexu.

**Během enzymové reakce zůstávají zkumavky s reakční směsí v termostatu.**

Jako kontrolní vzorky připravte:

- pro zkumavky č. 1–12: 1 ml Tris-Cl pufru, 25 ul roztoku BAPNA, 25 ul DMSO, 0,95 ml vody a 0,5 ml kyseliny octové,
- pro zkumavky č. 13–24: 1 ml Tris-Cl pufru, 50 ul roztoku BAPNA, 0,95 ml vody a 0,5 ml kyseliny octové.

Změřte absorbanci všech vzorků při vlnové délce 405 nm proti příslušnému kontrolnímu vzorku.

**Vyhodnocení:**

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou experimentálními ( $A_{405}$ ) a vypočtenými údaji ( $\epsilon_{\text{PNA}} = 9,62 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Experimentální výsledky graficky zpracujte pomocí linearizovaného výnosu podle Dixon.

Experimentálně zjištěné a vypočtené údaje nejprve přehledně shrňte do tabulky:

c(inhibitor) [mg.l <sup>-1</sup> ]:	c (BAPNA)[mmol.l <sup>-1</sup> ]:		c (BAPNA)[mmol.l <sup>-1</sup> ]:	
	v <sub>0</sub> [μmol.min <sup>-1</sup> ]	1/v <sub>0</sub>	v <sub>0</sub> [μmol.min <sup>-1</sup> ]	1/v <sub>0</sub>

Z grafu odečtete hodnotu  $K_i$  inhibitoru a určete, o jaký typ inhibice se jedná:

**$K_i$  (doplňte fyzikální rozměr):**   
**typ inhibice:**

Na základě znalosti reakce katalyzované trypsinem, struktury aktivního centra trypsinu, struktury substrátu a inhibitoru zjištěné výsledky vysvětlete:

## KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:

### ÚLOHA 9A

zk. č.	objem roztoku BAPNA [μl]	DMSO [μl]	A <sub>405</sub>
1	20	180	
2	20	180	
3	20	180	0,000
4	40	160	
5	40	160	
6	40	160	0,000
7	60	140	
8	60	140	
9	60	140	0,000
10	80	120	
11	80	120	
12	80	120	0,000
13	120	80	
14	120	80	
15	120	80	0,000
16	160	40	
17	160	40	
18	160	40	0,000
19	200	0,0	
20	200	0,0	
21	200	0,0	0,000

Podpis vedoucího cvičení:

**ÚLOHA 9B**

zk. č.	objem roztoku BAPNA [μl]	objem roztoku inhibitoru [μl]	objem DMSO [μl]	objem vody [μl]	A <sub>405</sub>
1	25	0	25	900	
2	25	0	25	900	
3	25	50	25	850	
4	25	50	25	850	
5	25	75	25	825	
6	25	75	25	825	
7	25	100	25	800	
8	25	100	25	800	
9	25	125	25	775	
10	25	125	25	775	
11	25	150	25	750	
12	25	150	25	750	
13	50	0	0	900	
14	50	0	0	900	
15	50	50	0	850	
16	50	50	0	850	
17	50	75	0	825	
18	50	75	0	825	
19	50	100	0	800	
20	50	100	0	800	
21	50	125	0	775	
22	50	125	0	775	
23	50	150	0	750	
24	50	150	0	750	

Podpis vedoucího cvičení: