

jména:	
obor:	datum provedení:

přílohy protokolu: 2 x graf: stanovení počáteční rychlosti metodou tečny (přirozený a umělý substrát), 2 x graf: stanovení počáteční rychlosti metodou extrapolace reakční rychlosti k nulovému času (přirozený a umělý substrát), 2 x graf: závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci enzymu (přirozený a umělý substrát)

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Trypsinová reakce, princip měření trypsinové aktivity s použitím přirozeného substrátu a umělého chromogenního substrátu. Rychlost enzymové reakce, počáteční rychlost enzymové reakce, jednotky rychlosti enzymové reakce, aktivita enzymu, jednotky enzymové aktivity, specifická aktivita enzymu, jednotky specifické aktivity enzymu, molekulární aktivita enzymu, jednotky molekulární enzymové aktivity. Lambertův-Beerův zákon. Chemické výpočty.

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

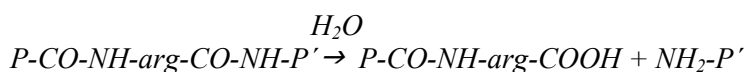
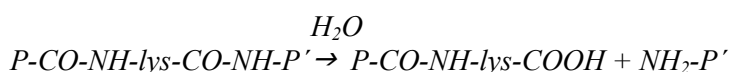
Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): části A a B, pouze s použitím přirozeného substrátu.

Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): jen část A.

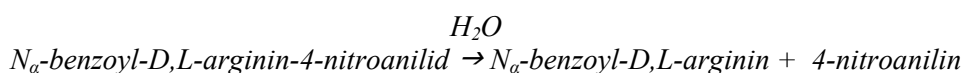
PRINCIP ÚLOHY

A. Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce

Trypsin patří mezi serinové proteasy a hydrolyzuje peptidovou vazbu bílkovin v místě karboxylových skupin zbytků lysinu a argininu:



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



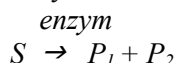
V kyselém prostředí absorbuje 4-nitroanilin viditelné záření s maximem v okolí vlnové délky 405 nm ($\epsilon_{PNA} = 9,62 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a jeho množství vzniklé enzymovou reakcí lze stanovit fotometricky. Okyselení vzorku zároveň ukončuje enzymovou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

Rychlost reakce je definována jako změna koncentrace látky c ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) za časovou jednotku t (s):
 $v [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] = dc/dt$

Pokud máme definovaný objem (objem se během reakce nemění), lze vyjádřit rychlost enzymové reakce v čase t (s):

$$v [\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}] = dn/dt$$

Jako jednoduchý příklad budeme nadále uvažovat enzymovou reakci, při níž se jeden substrát štěpí enzymem za vzniku dvou produktů:



Rychlost této reakce lze stanovit buď jako úbytek látkového množství substrátu S v čase t ($v_{\Delta S} = dS/dt$), anebo jako přírůstek látkového množství některého z produktů P_1 , P_2 v čase t ($v_{\Delta P} = dP_1/dt = dP_2/dt = dP/dt$). Pro reakci s uvažovanou stechiometrií platí: $v_{\Delta S} = v_{\Delta P}$. Rychlost enzymové reakce, do níž vstupuje pouze jeden substrát, je úměrná koncentraci substrátu - reakce probíhá podle kinetiky reakce prvního řádu. V průběhu reakce prvního řádu se s postupným poklesem koncentrace substrátu úměrně snižuje i rychlost reakce.

Podle kinetiky reakce prvního řádu probíhají také reakce, kterých se účastní více reagujících složek, avšak všechny kromě jedné jsou v reakčním prostředí ve značném nadbytku, a se tedy jejich koncentrace během reakce prakticky nemění. Jsou to např. i hydrolytické reakce, kde je jednou z reagujících složek voda ($A + H_2O \rightarrow B-H + C-OH$), jejíž koncentraci lze vzhledem k velkému nadbytku v roztoku (koncentrace vody je $55,6 \text{ mol.l}^{-1}$) považovat za konstantní.

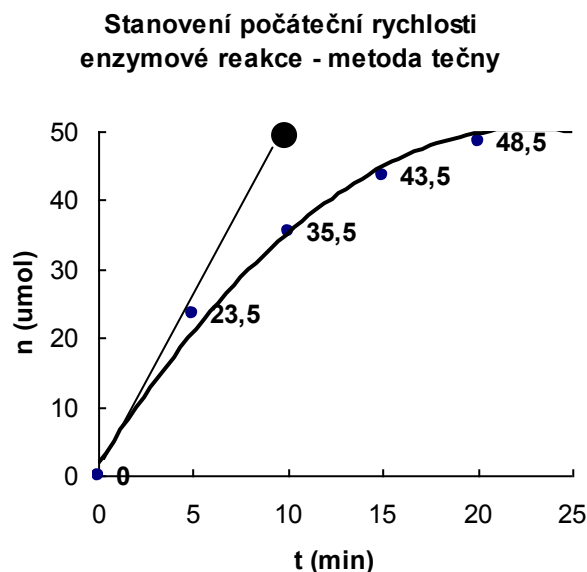
Je-li koncentrace substrátu vysoká a množství enzymu malé, pak může být reakční rychlost limitována množstvím enzymu a na koncentraci substrátu nezávisí. V takovém případě je množství přeměněného substrátu za časovou jednotku konstantní a reakční rychlost se v čase nemění - reakce probíhá podle kinetiky reakce nultého řádu.

Komplikace s proměnlivým řádem reakce lze eliminovat, jestliže je enzymová reakce charakterizována pomocí **počáteční rychlosti** v_0 ($v_{0\Delta S} = [dS/dt]_{t=0}$, $v_{0\Delta P} = [dP/dt]_{t=0}$). Na počátku reakce je v reakční směsi přítomen substrát v původní koncentraci, není přítomen reakční produkt, reakce probíhá počáteční (za daných podmínek maximální) rychlostí, koncentrace produktu roste v závislosti na čase lineárně a rychlost eventuelní vratné reakce je zanedbatelná. Počáteční rychlostí může enzymová reakce ve skutečnosti probíhat po určitou krátkou dobu, je-li substrát v nadbytku a jeho koncentrace v reakční směsi se tedy výrazně nemění, a je-li v reakční směsi zanedbatelná (vzhledem ke koncentraci substrátu) koncentrace produktu.

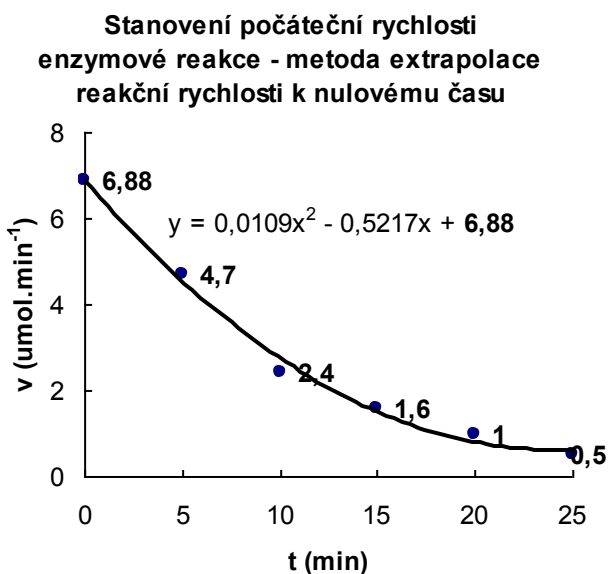
Počáteční rychlost enzymové reakce lze zjistit několika způsoby:

- *výpočtem* - je-li závislost úbytku množství substrátu nebo přírůstku množství produktu na čase po dobu průběhu reakce skutečně lineární, pak $v_{0\Delta S} = \Delta S/\Delta t$, $v_{0\Delta P} = \Delta P/\Delta t$,
- *metodou tečny* - reakční rychlost lze zjistit jako směrnici tečny (s počátkem v čase 0) nelineární závislosti úbytku látkového množství substrátu nebo přírůstku látkového množství produktu na čase (viz obrázek),
- *metodou extrapolace reakční rychlosti k nulovému času* (viz obrázek).

V praxi se obvykle, je-li k dispozici vhodná analytická metoda, měří v závislosti na čase přírůstek produktu. Pokud by se měřil úbytek substrátu, je zřejmé, že by musel být signifikantní a nebyla by tedy dodržena podmínka přibližně konstantní koncentrace substrátu po celou dobu reakce v reakční směsi.



K nelineární závislosti *látkového množství vzniklého produktu na době reakce* byla sestrojena tečna s počátkem v čase 0. Směrnice tečny (velikost úseku na ose y odpovídající jednotkovému úseku osy x) udává počáteční rychlost reakce v_0 [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$] (směrnice = cca $50/10 = 5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) Metoda tečny bývá zatížena subjektivní chybou při sestrojování tečny.



V pětiminutových intervalech byla vypočítána rychlost reakce jako podíl vzniklého látkového množství produktu v daném časovém intervalu a doby reakce (5 minut). Do grafu byla vynesena závislost *reakční rychlosti na celkové době reakce* a extrapolována k nulovému času tak, že závislost byla proložena polynomičká křivka a zobrazena rovnice regrese, jejíž poslední člen udává velikost úseku na ose y (hodnotu počáteční rychlosti enzymové reakce).

Počáteční rychlost trypsinové reakce bude v úloze stanovena:

- s použitím přirozeného bílkovinného substrátu (želatiny), kdy bude rychlost štěpení bílkoviny trypsinem sledována titračně stanovením množství volných karboxylových skupin peptidových řetězců zakončených zbytky lysinu nebo argininu (princip neutralizační titrace volných karboxylových skupin aminokyselin nebo peptidů viz úloha 2, tzv. formolová titrace),
- s použitím umělého chromogenního substrátu (BAPNA), kdy bude rychlost štěpení substrátu trypsinem sledována fotometricky stanovením množství 4-nitroanilinu (PNA).

Titrační metoda nedává v případě bílkovinných hydrolyzátů zcela spolehlivé výsledky, neboť nelze přesně určit reakční stechiometrii: spotřebu titračního činidla ovlivňuje přítomnost funkčních skupin některých aminokyselin ve zbytcích polypeptidických řetězců (spotřebu snižují ϵ -aminoskupiny lysinu a argininu, spotřebu zvyšují karboxylové skupiny v bočních řetězcích kyseliny asparagové a kyseliny glutamové a fenolická skupina tyrosinu).

B. Aktivita enzymu, molekulární aktivita enzymu

Je-li v reakční směsi dostatečný nadbytek substrátu, probíhá enzymová reakce podle kinetiky nultého řádu (rychlost je nezávislá na koncentraci substrátu), přičemž rychlost reakce je přímo úměrná koncentraci enzymu:

$$v [\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}] = k \cdot [\text{E}]$$

Pomocí rychlosti enzymové reakce lze nepřímo vyjádřit množství enzymu v reakční směsi jako **aktivitu enzymu** na základě jeho schopnosti katalyzovat přeměnu substrátu na produkt. (Jednotky enzymové aktivity tedy mají stejný fyzikální rozměr jako rychlost enzymové reakce.) Aktivita se udává v jednotce **1 katal (kat) = mol/s**.

V praxi se toto nepřímé vyjádření běžně používá namísto přímého určení koncentrace enzymu např. jako molární nebo hmotnostní koncentrace, neboť stanovit látkové množství nebo hmotnost enzymu obsaženého v biologickém materiálu je velmi obtížné. Podmínkou správného stanovení aktivity enzymu je jeho saturace substrátem po celou dobu reakce a optimální reakční podmínky.

Je-li známa molární koncentrace enzymu $[\text{E}]$, lze z rychlosti enzymové reakce vypočítat rychlostní konstantu k . Tato konstanta udává **molekulární aktivitu enzymu (katalytická konstanta, číslo přeměny)** $[\text{s}^{-1}, \text{min}^{-1}]$, což je počet molekul (molů) substrátu přeměněných jednou molekulou (molem) enzymu za časovou jednotku. Vysoké číslo přeměny znamená, že katalyzovaná reakce probíhá vysokou rychlostí.

Molekulární aktivita trypsinu bude v úloze stanovena:

- s použitím přirozeného bílkovinného substrátu (želatiny), kdy bude aktivita trypsinu sledována titračně stanovením množství volných karboxylových skupin peptidových řetězců zakončených zbytky lysinu nebo argininu (princip neutralizační titrace volných karboxylových skupin aminokyselin nebo peptidů viz úloha 2, tzv. formolová titrace),
- s použitím umělého chromogenního substrátu (BAPNA), kdy bude aktivita trypsinu sledována fotometricky stanovením množství 4-nitroanilinu (PNA).

Relativní molekulová hmotnost trypsinu je cca 23 300.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce

Materiál a vybavení:

preparát trypsinu (pevný trypsin byl smíchán s pevnou glukosou v hmotnostním poměru 1:19, z této směsi byl připraven 0,5 % vodný roztok)
5 % želatina (vodný roztok)
40 % formaldehyd
0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný
0,02 mol.l⁻¹ hydroxid sodný
1 % roztok fenolftaleinu v ethanolu
5 mmol.l⁻¹ roztok BAPNA ve směsi vody a dimethylsulfoxidu
60 mmol.l⁻¹ Tris-Cl pufr (pH 8.2) s přídatkem 30 mmol.l⁻¹ CaCl₂
30 % kyselina octová
odměrné válce, kádinky, Pasteurovy pipety, titrační baňky, byreta 25 ml, krátké zkumavky, pipety, dávkovače, vortex, termostat, stopky, fotometr

Postup:

Stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím přirozeného substrátu: Smíchejte v kádince 75 ml 40 % formaldehydu a 150 ml vody, do další kádinky odměřte 120 ml roztoku želatiny a do další 30 ml enzymového preparátu. Do všech roztoků přidejte několik kapek fenolftaleinu a 0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný do slabě růžového zbarvení. Roztoky želatiny a trypsinu vytemperujte na teplotu 37 °C. Neutralizovaný roztok formaldehydu rozpipetujte do titračních baněk - připravte sadu 14 titračních baněk obsahujících 15 ml neutralizovaného zředěného roztoku formaldehydu.

Formaldehyd je látka zdraví silně škodlivá, při zacházení s ním dodržujte všechna bezpečnostní a hygienická pravidla!

Smíchejte připravené roztoky želatiny a trypsinu, promíchejte, zapněte stopky a ihned odeberte dvakrát 10 ml směsi do dvou titračních baněk obsahujících formaldehyd (odběr vzorků v čase 0 - slepý vzorek). Ihned po odebrání alikvoty 10 ml vraťte reakční směs zpět do termostatu. Oba vzorky titrujte 0,02 mol.l⁻¹ hydroxidem sodným do trvale růžového zbarvení.

Další vzorky (vždy dva paralelní vzorky) odebírejte (z temperované reakční směsi) a titrujte stejným způsobem 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minut po zahájení enzymové reakce. Ihned po odebrání alikvotů vraťte reakční směs zpět do termostatu

doba reakce t [min]	0	5	10	15	20	25	30
spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]							
průměrná spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]							
průměrná spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH po odečtení spotřeby slepého vzorku [ml]*							
látkové množství spotřebovaného 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [μmol]							
látkové množství volných -COOH skupin v 10 ml reakční směsi [μmol]							
látkové množství volných -COOH skupin v 1 ml reakční směsi [μmol]							
přírůstek látkového množství volných -COOH skupin v daném časovém intervalu (5 min) v 1 ml reakční směsi [μmol]							
reakční rychlost v daném časovém intervalu (5 min) v 1 ml reakční směsi [μmol.min ⁻¹]							

*) další výpočty již po odečtení spotřeby slepého vzorku

Stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím chromogenního substrátu: Přichystejte sadu 12 zkumavek obsahujících 0,25 ml roztoku kyseliny octové. V titrační baňce smíchejte 7,5 ml Tris-Cl pufru, 3,75 ml vody a 1,5 ml roztoku BAPNA. Baňku s reakční směsí vytemperujte na teplotu 37 °C. Do baňky přidejte 2,25 ml roztoku trypsinu, vzorek dobře promíchejte, zapněte stopky a přesně po 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minutách odeberte z baňky vždy dvakrát 1 ml reakční směsi a přeneste jej do zkumavek obsahujících roztok kyseliny octové. Vzorky důkladně promíchejte na vortexu.

Jako slepý vzorek připravte směs 0,5 ml Tris-pufu, 0,4 ml vody, 0,1 ml roztoku BAPNA a 0,25 ml roztoku kyseliny octové. Změřte absorbanci všech vzorků při vlnové délce 405 nm proti slepému vzorku. Přesahují-li absorbance hodnotu 0,8, vzorky podle potřeby definovaným způsobem nařeďte vodou (včetně slepého vzorku) - zvolte vhodné násobné ředění. Při pětinasobném a větším ředění lze vzorky měřit proti vodě.

zkumavka č.	doba reakce t [min]	A ₄₀₅	ØA ₄₀₅	ředění vzorku
1	5			
2				
3	10			
4				
5	15			
6				
7	20			
8				
9	25			
10				
11	30			
12				

Vyhodnocení:

Stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím přirozeného substrátu: Do protokolu uveďte tabulku obsahující experimentální (spotřeba hydroxidu sodného při jednotlivých titracích) a vypočtené údaje.

převažující stechiometrie formolové titrace:

Vypočítejte počáteční rychlost trypsinové reakce jako podíl látkového množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi a doby reakce pro prvních 5 minut reakce.

Do grafu vyneste závislost *látkového množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi na čase* a k závislosti sestrojte tečnu s počátkem v čase 0. Ze směrnice tečny vypočtete počáteční rychlost trypsinové reakce jako rychlost vzniku volných skupin -COOH.

Vypočítejte látkové množství produktu (v 1 ml reakční směsi) v dalších pětiminutových intervalech a reakční rychlost v těchto intervalech. Do grafu vyneste *závislost reakční rychlosti na celkové době reakce*. Závislost extrapolujte k nulovému času a na ose y odečtete hodnotu počáteční reakční rychlosti trypsinové reakce jako rychlosti vzniku volných skupin -COOH.

Hodnoty počáteční rychlosti trypsinové reakce stanovené různým postupem zpracování výsledků uveďte do tabulky na konci části Vyhodnocení.

Stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím chromogenního substrátu: Do protokolu uveďte tabulky doplněné experimentálními (A_{405}) a vypočtenými údaji. ($\epsilon_{\text{PNA}} = 9,62 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

zkumavka č.	doba reakce t [min]	c (PNA) [mmol.l ⁻¹]	n (PNA) v ml reakční směsi [μmol]	dn (PNA)/ ml reakční směsi	reakční rychlost v daném časovém intervalu [μmol.min ⁻¹]/ml reakční směsi
1	5				
2					
3	10				
4					
5	15				
6					
7	20				
8					
9	25				
10					
11	30				
12					

Vypočítejte počáteční rychlost trypsinové reakce jako podíl látkového množství PNA v 1 ml reakční směsi a doby reakce pro prvních 5 minut reakce.

Do grafu vynesete závislost *látkového množství PNA v 1 ml reakční směsi na čase* a k závislosti sestrojíte tečnu s počátkem v čase 0. Ze směrnice tečny vypočtete počáteční rychlost trypsinové reakce jako rychlost vzniku PNA.

Vypočítejte látkové množství produktu (v 1 ml reakční směsi) v dalších pětiminutových intervalech a reakční rychlost v těchto intervalech. Do grafu vynesete závislost *reakční rychlosti na celkové době reakce*. Závislost extrapolujte k nulovému času a na ose y odečtete hodnotu počáteční reakční rychlosti trypsinové reakce jako rychlosti vzniku PNA.

Hodnoty počáteční rychlosti trypsinové reakce stanovené různým postupem zpracování výsledků uveďte do tabulky na konci části Vyhodnocení.

Vypočítejte *hmotnost čistého trypsinu obsaženého v 1 ml reakčních směsí*, všechny výpočty uveďte do protokolu:

reakční směs obsahující přirozený substrát:

m = mg

reakční směs obsahující chromogenní substrát:

m = mg

Uveďte počáteční rychlost reakce vztaženou na 1 mg čistého trypsinu, údaje uveďte do tabulky.

stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím přirozeného substrátu		
v_0^* vypočtená	[$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
jako $\Delta P/\Delta t$ pro prvních 5 min reakce		
ze směrnice tečny závislosti P na dt		
z extrapolované hodnoty v_0 závislosti v na dt		
stanovení počáteční rychlosti trypsinové reakce s použitím chromogenního substrátu		
v_0^* vypočtená	[$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
jako $\Delta P/\Delta t$ pro prvních 5 min reakce		
ze směrnice tečny závislosti P na dt		
z extrapolované hodnoty v_0 závislosti v na dt		

*) na ml reakční směsi

PRAKTICKÁ ČÁST B. Aktivita enzymu, molekulární aktivita enzymu

Materiál a vybavení:

preparát trypsinu (pevný trypsin byl smíchán s pevnou glukosou v hmotnostním poměru 1:19, z této směsi byl připraven 0,5 % vodný roztok)
 5 % želatina (vodný roztok)
 40 % formaldehyd
 0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný
 0,02 mol.l⁻¹ hydroxid sodný
 1 % roztok fenolftaleinu v ethanolu
 5 mmol.l⁻¹ roztok BAPNA ve směsi vody a dimethylsulfoxidu
 60 mmol.l⁻¹ Tris-Cl pufr (pH 8.2) s přidavkem 30 mmol.l⁻¹ CaCl₂
 30 % kyselina octová
odměrné válce, kádinky, Pasteurovy pipety, titrační baňky, byreta 25 ml, krátké zkumavky, pipety, dávkovače, vortex, termostat, stopky, fotometr

Postup:

Stanovení aktivity enzymu s použitím přirozeného substrátu: Smíchejte v kádince 50 ml 40 % formaldehydu a 100 ml vody, do další kádinky odměřte 80 ml roztoku želatiny a do další 20 ml enzymového preparátu. Do všech roztoků přidejte několik kapek fenolftaleinu a 0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný do slabě růžového zbarvení. Roztoky želatiny a trypsinu vytemperujte na teplotu 37 °C. Neutralizovaný roztok formaldehydu rozpipetujte do titračních baněk - připravte sadu 10 titračních baněk obsahujících 15 ml neutralizovaného zředěného roztoku formaldehydu.

Formaldehyd je látka zdraví silně škodlivá, při zacházení s ním dodržujte všechna bezpečnostní a hygienická pravidla!

Do další temperované titrační baňky odpipetujte 8 ml roztoku želatiny, přidejte k němu 1,5 ml vody a 0,5 ml enzymového preparátu. Vzorek promíchejte, zapněte stopky a přesně po 5 minutách vzorek přelijte do titrační baňky obsahující formaldehyd. Vzorek titrujte 0,02 mol.l⁻¹ hydroxidem sodným do trvale růžového zbarvení. Další reakce proveďte stejným způsobem podle rozpisu v tabulce – do reakční směsi postupně přidávejte větší objem enzymového preparátu na úkor objemu vody, každou reakci proveďte dvakrát. Jako slepý vzorek titrujte v čisté baňce (pozor na stopy trypsinu z předchozích pokusů) reakční směs obsahující pouze roztok želatiny a vodu.

pipetovaný objem enzymového preparátu [ml]	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
pipetovaný objem vody [ml]	2,0	1,5	1,0	0,5	0,0
spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]					
průměrná spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]					
průměrná spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH po odečtení spotřeby slepého vzorku [ml]					
látkové množství spotřebovaného 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [μmol]*					
látkové množství volných skupin -COOH v 10 ml reakční směsi [μmol]					
látkové množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi [μmol]					
aktivita enzymu v 1 ml reakční směsi [μmol.min ⁻¹]					
aktivita enzymu v 1 ml reakční směsi [nkat]					

*další výpočty již po odečtení spotřeby slepého vzorku

Stanovení aktivity enzymu s použitím chromogenního substrátu: Do 12 zkumavek (paralelní dvojice) pipetujte postupně 1 ml Tris-Cl pufru a dále podle rozpisu:

zkumavka č.	objem enzymového preparátu [μl]	objem vody [μl]	start reakce - čas na stopkách	konec reakce - čas na stopkách	A ₄₀₅	ØA ₄₀₅	ředění vzorku
1	25	775	0''	5'			
2			20''	5'20''			
3	50	750	40''	5'40''			
4			1'	6'			
5	75	725	1'20''	6'20''			
6			1'40''	6'40''			
7	100	700	2'	7'			
8			2'20''	7'20''			
9	125	675	2'40''	7'40''			
10			3'	8'			
11	150	650	3'20''	8'20''			
12			3'40''	8'40''			

Zkumavky vytemperujte na teplotu 37 °C. Enzymovou reakci startujte přidavkem 200 μl roztoku BAPNA v intervalech 20 sekund (po přidavku BAPNA reakční směs promíchejte na vortexu) a reakci přesně po 5 minutách zastavte přidavkem 0,5 ml roztoku kyseliny octové a směs důkladně promíchejte na vortexu. Jako slepý vzorek připravte směs 1 ml Tris-Cl pufru, 0,2 ml roztoku BAPNA, 0,5 ml roztoku kyseliny octové a 0,8 ml vody.

Během enzymové reakce zůstávají zkumavky s reakční směsí v termostatu.

Změřte absorbanci všech vzorků při vlnové délce 405 nm proti slepému vzorku. Přesahují-li absorbance hodnotu 0,8, vzorky nařed'te vodou (včetně slepého vzorku) - zvolte vhodné násobné ředění. Při pětinasobném a větším ředění lze vzorky měřit proti vodě.

Vyhodnocení:

Stanovení aktivity enzymu s použitím přirozeného substrátu: Do protokolu uveďte tabulku obsahující experimentální (spotřeba hydroxidu sodného při jednotlivých titracích) a vypočtené údaje.

převažující stechiometrie formolové titrace:

Aktivitu trypsinu vypočítejte jako poměr přírůstku látkového množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi a doby reakce. Dále vypočítejte hmotnostní a molární koncentraci enzymu v reakční směsi, doplňte údaje v následující tabulce a sestrojte graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci enzymu v reakční směsi. Molekulární aktivitu enzymu počítejte pouze pro lineární oblast závislosti. Případné odchylky od linearity vysvětlete:

pipetovaný objem enzymového preparátu [ml]	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
koncentrace trypsinu v reakční směsi [mg.ml ⁻¹]	0,0				
hmotnost trypsinu obsaženého v 1 ml reakční směsi [mg]					
látkové množství trypsinu obsaženého v 1 ml reakční směsi [nmol]					
aktivita trypsinu v 1 ml reakční směsi [nkat]					
molekulární aktivita trypsinu [s ⁻¹]					

Stanovení aktivity enzymu s použitím chromogenního substrátu: Do protokolu uveďte tabulky doplněné experimentálními (A_{405}) a vypočtenými údaji. ($\epsilon_{\text{PNA}} = 9,62 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

zk. č.	pipetovaný objem enzymového preparátu [μl]	koncentrace trypsinu v reakční směsi [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$]	n trypsinu [nmol] v ml reakční směsi	c (PNA) [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]	n PNA [μmol] v ml reakční směsi	aktivita trypsinu [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$]	aktivita trypsinu [kcat]	molekulární aktivita trypsinu [s^{-1}]
1 2	25							
3 4	50							
5 6	75							
7 8	100							
9 10	125							
11 12	150							

Aktivitu trypsinu vypočítejte jako poměr přírůstku látkového množství 4-nitroanilinu v 1 ml reakční směsi a doby reakce. Dále vypočítejte hmotnostní a molární koncentraci enzymu v reakční směsi, doplňte údaje v tabulce a sestrojte graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci enzymu v reakční směsi. Molekulární aktivitu enzymu počítejte pouze pro lineární oblast závislosti. Případné odchylky od linearitě vysvětlete:

Srovnajte molekulární aktivitu trypsinu v přítomnosti přirozeného a umělého substrátu:

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:

ÚLOHA 8A – přirozený substrát

doba reakce t [min]	0	5	10	15	20	25	30
spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]							

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 8A – chromogenní substrát

zkumavka č.	doba reakce t [min]	ředění vzorku	A ₄₀₅ zředěného vzorku
1	5		
2			
3	10		
4			
5	15		
6			
7	20		
8			
9	25		
10			
11	30		
12			

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 8B – přirozený substrát

pipetovaný objem enzymového preparátu [ml]	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
pipetovaný objem vody [ml]	2,0	1,5	1,0	0,5	0,0
spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]					

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 8B – chromogenní substrát

zkumavka č.	objem enzymového preparátu [μl]	objem vody [μl]	ředění vzorku	A ₄₀₅ zředěného vzorku
1	25	775		
2				
3	50	750		
4				
5	75	725		
6				
7	100	700		
8				
9	125	675		
10				
11	150	650		
12				

Podpis vedoucího cvičení: