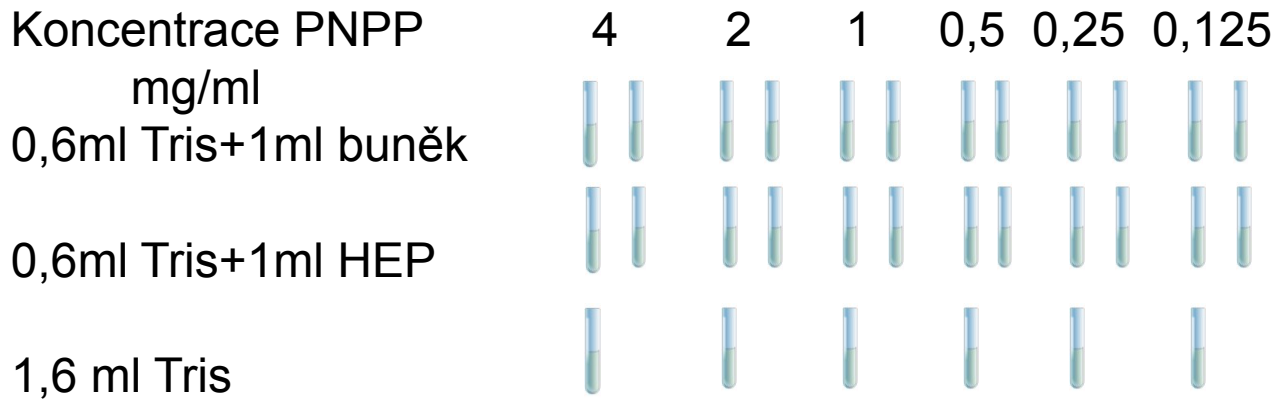
Stanovení fosfatázové aktivity acetonového prášku a nativních buněk

- 24h kultura buněk (CCM1000) – centrifugace a 2x promytí v Tris pufru
- resuspenduji v Tris pufru na zákal 80% (T=20), 620nm
- stanovím sušinu
- připravím roztok acetonového prášku (HEP): 2mg do 20ml Tris pufru
- zásobní roztok PNPP (4mg/ml) naředím na: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg/ml
- zkumavky s 0,6 ml Tris p. + 1 ml HEP/buněk dám temperovat – lázeň 40^{o}C
- reakci nastartuji přidáním 0,2 ml PNPP příslušné koncentrace
- inkubuji 5-10 min (dle zabarvení)
- reakci zastavím přidáním 2ml 1M NaOH
- zkumavky s buňkami zcentrifuguji
- měřím zabarvení vzniklého PNP na Spekolu 20 – 400nm



Závěr: Výpočet Km sestrojení grafu závislosti rychlosti štěpení PNPP (nmol PNP/mg suš/min) na jeho koncentraci v reakční směsi