

Enzymová aktivita

Úloha 1

25 mg laktátdehydrogenasy o specifické aktivitě $90 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ se prodává za 4 266,- Kč. Kolik by stál 1 katal enzymu?

Úloha 2

Při měření aktivity alaninaminotransferasy (ALT) byla po zahájení reakce přidávkem 100 mm^3 krevního séra do 1 cm^3 reakční směsi stanovena rychlost $2,4 \text{ nmol alaninu} \cdot \text{min}^{-1}$. Vypočtete katalytickou koncentraci ALT v krevním séru v $\text{kat} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Úloha 3

Krystalická pyruvátkinasa z králíčího svalu má specifickou aktivitu $2 \text{ kat} \cdot \text{kg}^{-1}$. Vypočítejte molekulární aktivitu enzymu, je-li jeho M_r rovna 230 000.

Úloha 4

Z enzymového preparátu katalasy ($M_r = 225\,000$) o čistotě 85% byl připraven roztok o koncentraci $2,95 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vypočítejte molekulární aktivitu katalasy v jednotkách s^{-1} , uvolní-li 0,1 ml roztoku z nadbytku peroxidu vodíku za 10 min $340 \text{ mm}^3 \text{ O}_2$ (objem kyslíku je přepočten na normální podmínky).

Úloha 5

Hydrolyza difosfátu na dvě molekuly fosfátu je u bakterie *Escherichia coli* katalyzována difosfatasou o relativní molekulové hmotnosti 120 000, složené ze 6 identických podjednotek. 1 mg izolovaného enzymu za optimálních podmínek rozštěpil během 15 min 28 mmol difosfátu. Vypočítejte molekulární aktivitu enzymu, aktivitu katalytického centra a dobu potřebnou k uskutečnění jednoho katalytického cyklu.

Úloha 6

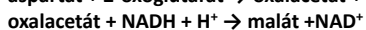
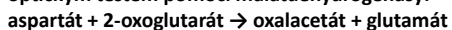
Molekula enzymu sestává ze dvou identických podjednotek o $M_r = 40\,000$, z nichž každá nese aktivní centrum s katalytickou aktivitou 10 s^{-1} . Vypočtete čistotu enzymového preparátu v %, je-li jeho specifická aktivita $50\text{ nkat.}(\text{mg proteinu})^{-1}$.

Úloha 7

1 g čerstvé tkáně (80% vody) obsahuje $0,67\text{ }\mu\text{kat}$ enzymu s molekulární aktivitou 1000 s^{-1} . Vypočtete molární koncentraci enzymu v buňce. Veškerou vodu považujte za intracelulární.

Úloha 8

V klinické biochemii má význam stanovení aktivity aspartátaminotransferasy (AST) v krevním séru, které lze uskutečnit optickým testem pomocí malátdehydrogenasy:



K reakční směsi o objemu $0,9\text{ cm}^3$ obsahující $0,1\text{ cm}^3$ testovaného séra, 300 nmol NADH a nadbytek aspartátu a malátdehydrogenasy byl přidán nadbytek α -oxoglutarátu v $0,1\text{ cm}^3$. Po krátkém lagu klesala absorbance roztoku při 340 nm v 1 cm kyvetě konstantní rychlostí $0,04\text{ min}^{-1}$. Je-li absorpční koeficient NADH roven $6\,220\text{ cm}^2\cdot\text{mmol}^{-1}$, vypočtete aktivitu AST v séru v jednotkách $\text{kat}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Úloha 9

Bezbuňčný extrakt *Penicillium chrysogenum* vykazuje β -galaktosidasovou aktivitu, měřitelnou pomocí umělého substrátu *p*-nitrofenyl- β -galaktosidu. 0,25 ml extraktu obsahujícího 5 mg proteinu v 1 ml bylo inkubováno s *p*-nitrofenyl- β -galaktosidem v celkovém objemu 1 ml. Po 2, 4 a 6 minutách byly odebrány vzorky 0,1 ml, přeneseny do 2,9 ml NaOH ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a v 1 cm kyvetě změřena jejich absorbance při 400 nm odpovídající uvolněnému *p*-nitrofenolu ($\epsilon = 18\,300 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$). Tímto postupem byly získány hodnoty absorbance rovné 0,09, 0,18 a 0,27. Vypočítejte specifickou aktivitu β -galaktosidasy v extraktu v $\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Úloha 10

Při hydrolýze esteru v neutrálním pH se uvolňuje ekvivalentní množství protonů, jež lze kvantifikovat fotometricky pomocí vhodného indikátoru pH. Při vyhledávání hydrolas vhodných pro biotechnologické aplikace bylo 5 μl vzorku enzymu mícháno se 100 μl reakční směsi v jamkách na mikrotitrační destičce. Výsledná směs obsahovala 1 mM substrát (ester), 4,65 mM BES (pufr, $\text{pK}_a = 7,15$), 0,434 mM 4-nitrofenol (indikátor pH, protonovaná forma bezbarvá, deprotonovaná forma žlutá, $\text{pK}_a = 7,2$); počáteční pH činilo 7,2. Pokles absorbance při vlnové délce 404 nm činil $0,03 \text{ min}^{-1}$. Vypočítejte katalytickou koncentraci hydrolasy ve vzorku (v $\text{kat} \cdot \text{dm}^{-3}$), je-li rozdíl absorpčních koeficientů deprotonované a protonované formy indikátoru $17\,300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a délka optické dráhy 0,3 cm.

Úloha 11

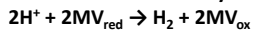
Excitační a emisní fluorescenční spektra volného 7-amino-4-methylkumarinu (AMC) jsou posunuta k delším vlnovým délkám oproti spektrům AMC navázaného amidovou vazbou na peptid. Lze proto zvolit takovou excitační vlnovou délku, při které fluoreskuje pouze volný a nikoli vázaný AMC. Toho se využívá při fluorimetrickém měření aktivit peptidas. Při měření byla citlivost fluorimetru předem nastavena tak, aby fluorescence vzorku 2 cm^3 1 μM AMC odpovídala 100. Po nastartování reakce v 2 cm^3 reakční směsi fluorescence vzrostla za 1 min o 20. Jaká je aktivita peptidasy přítomné v kyvetě (v jednotkách kat)?

Úloha 12

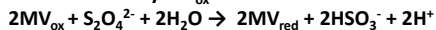
Při oxygrafickém stanovení aktivity aktivity enzymu redukujícího kyslík byly do nádoby oxygrafu obsahující 2 ml reakční směsi přidány 2 μl preparátu o koncentraci proteinu $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. V důsledku toho poklesl během 1 min obsah kyslíku v nádobce o 32%. Vypočtete specifickou aktivitu enzymu v $\text{kat}\cdot\text{kg}^{-1}$, má-li nasycený roztok kyslíku v médiu (odpovídající parciálnímu tlaku kyslíku ve vzduchu) koncentraci $2,4\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jak by se dalo experimentálně zjistit, je-li produktem redukce kyslíku voda nebo peroxid vodíku?

Úloha 13

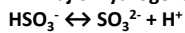
pH-statu bylo použito k měření aktivity hydrogenasy, která redukuje protony (H^+) na molekulový vodík (H_2). Jako zdroj elektronů sloužil redoxní mediátor methylviologen (MV):



Redukovaná forma MV_{red} se kontinuálně obnovovala redukcí oxidované formy MV_{ox} dithioničitanem:



Vznikající hydrogensulfid částečně disocioval ($\text{pK}_a = 7,2$)



Určete hydrogenasovou aktivitu ($\text{mol H}_2\cdot\text{s}^{-1}$) v nádobce, je-li při $\text{pH} = 6,8$ spotřeba $1 \text{ nmol NaOH}\cdot\text{s}^{-1}$.

Úloha 14

Odhadněte intracelulární koncentrace enzymů na základě následujících zjednodušujících předpokladů:

- čerstvá tkáň obsahuje pouze intracelulární vodu, která tvoří 80% její hmotnosti,
- obsah proteinu činí 15%,
- všechny rozpustné proteiny jsou enzymy,
- jejich průměrná relativní molekulová hmotnost je rovna 150000,
- v buňce je přítomno tisíc různých druhů enzymů ve stejných koncentracích.

Úloha 15

Chorismátmutasa/prefenátdehydrogenasa (EC 5.4.99.5/1.3.1.12) je bifunkční enzym katalyzující dva následné kroky v biosyntéze tyrosinu. Enzym izolovaný z *Escherichia coli* K12 představuje homodimer o relativní molekulové hmotnosti 78000. Jeho intracelulární koncentrace, která obvykle činí asi $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} , je osmdesátinásobně zvýšena u regulační mutanty JP 2319. Buňku *E. coli* lze aproximovat válcem s průměrem podstavy 0,8 μm a výškou 2 μm .

Při kultivaci *E. coli* JP 2319 se z 1 dm^3 kultivačního media získá asi $2 \cdot 10^{12}$ buněk. Určete, kolik dm^3 media je zapotřebí zpracovat k izolaci 50 mg enzymu, poskytuje-li používaný purifikační postup 26 % výtěžku enzymové aktivity.

Úloha 16

Ceruloplasmin (ferroxidasa) je plazmatická bílkovina tvořená v játrech, která se účastní transportu mědi; má však i oxidoreduktasovou aktivitu. Po purifikaci ceruloplasminu z krevní plazmy (3,5 l, koncentrace proteinu 80 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) byla získána frakce o objemu 0,18 l (koncentrace proteinu 0,6 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Vypočítejte stupeň přečištění a výtěžek ceruloplasminu, byla-li v 1 ml výchozí plazmy přítomna *p*-fenylendiaminoxidasová aktivita 0,246 nkat, kdežto aktivita 0,05 ml finální frakce činila 0,157 nkat.

Úloha 17

Extrakt z lidské placenty má schopnost oxidovat různé diaminy (např. kadaverin) i monoaminy (např. histamin). Purifikace příslušného enzymu probíhala v následujících krocích:

- (1) Z 9620 cm^3 extraktu byl síranem amonným vysrážen protein do 65% nasycení a sediment byl rozpuštěn v 3000 cm^3 pufru.
 - (2) Srážení síranem amonným bylo opakováno (35 - 65% nasycení), sediment byl rozpuštěn v 223 cm^3 pufru.
 - (3) Roztok enzymu získaný v 2) byl chromatografován na koloně s DEAE celulosou; aktivní frakce byla obsažena v 344 cm^3 eluátu.
 - (4) Předchozí frakce byla chromatografována na fosfocelulose; aktivní frakce eluátu měla objem 440 cm^3 .
 - (5) Po zahuštění pomocí polyethylenglykolu byl enzymový preparát podroben gelové filtraci na Sephadexu G-200; aktivní frakce byla obsažena ve 130 cm^3 eluátu.
- Ve výchozím extraktu i jednotlivých frakcích během preparace byly stanoveny enzymové aktivity s kadaverinem resp. histaminem jako substráty (udávané konvenční jednotky se vztahují k použité spektrofotometrické metodě měření). Ke srovnání koncentrací proteinu v jednotlivých frakcích sloužily hodnoty absorpance při vlnové délce 280 nm (A_{280}).

Úloha 17- pokračování

frakce	výchozí	1	2	3	4	5
A ₂₈₀	12	17,8	47,6	11,5	1,06	1,16
aktivita, jednotky v 1 cm ³ kadaverin	4,8	11,9	971	356	105	364
aktivita, jednotky v 1 cm ³ histamin	4,75	6,8	155,4	81,9	22	76,5

Diskutujte průběhy specifických a celkových aktivit při purifikaci. Jaké lze určit závěry o počtu přítomných enzymů a jejich substrátové specifitě?
