

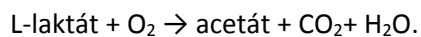
Stanovení substrátů

Úloha 1

Enzymové stanovení nízkých koncentrací dusičnanu spočívá v jeho konverzi na dusitan účinkem nitrátreduktasy obsažené v cytoplazmatické membráně *Escherichia coli*. Vzniklý dusitan se po zastavení reakce stanoví kolorimetricky citlivou diazotačně-kopulační reakcí. Protože K_M enzymu pro dusičnan je poměrně vysoká (0,3 mmol/l), probíhá konverze při dostatečně nízkých počátečních koncentracích NO_3^- jako reakce prvního řádu. Za tohoto předpokladu vypočtete látkové množství dusitanu (nmol), které vznikne v reakční směsi o objemu 2 ml po 5 resp. 10 minutách inkubace, je-li přítomna nitrátreduktasa o aktivitě 1 nebo 2 nkat a dusičnan v počátečním látkovém množství 50 nebo 100 nmol. Diskutujte, jak závisí množství vzniklého NO_2^- na počátečním množství NO_3^- , na době inkubace a použité aktivitě enzymu.

Úloha 2

Laktát oxidasa z bakterie *Diplococcus pneumoniae* oxiduje L-laktát podle rovnice:



Jako prostetickou skupinu enzym obsahuje FMN. Je-li k dispozici apoenzym, lze měření rychlosti reakce využít ke stanovení FMN. Při kalibraci byly do reakční směsi (2.1 ml) v nádobce oxygrafu obsahující apoenzym a laktát aplikovány přídávky známého látkového množství FMN (n). Příslušné rychlosti spotřeby O₂ v dílcích na oxygrafickém záznamu za minutu udává tabulka:

n (nmol)	0,1	0,2	0,3	0,5	1,0	5,0
v (dílký/min)	1,8	3,3	4,6	6,7	10,0	16,7

Sestrojte graf závislosti $1/v$ na $1/n$ a použijte jej k odečtení počtu nmolů FMN ve vzorcích, pro něž se v rovná a) 2,5, b) 5,7 a c) 15 dílků/min. Jaká je hodnota Michaelisovy konstanty apoenzymu pro FMN?

Úloha 3

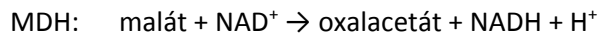
Enzym alkoholdehydrogenasa z koňských jater (LADH) má poměrně nízkou substrátovou specifitu, takže může kromě oxidace alkoholů NAD^+ (nebo redukce aldehydů či ketonů NADH) uskutečňovat i redukci určitých arylnitrosolátek. Tato vlastnost se stala podkladem pro vypracování citlivé kinetické metody stanovení malých množství koenzymu NAD^+ resp. NADH : K pufrovanému roztoku obsahujícímu LADH, cyklohexanol a *p*-nitroso-*N,N*-dimethylanilin (NDMA) se přidá vzorek koenzymu a měří se rychlost poklesu absorbance ($-\Delta A/\Delta t$) NDMA ($\epsilon_{440} = 3540 \text{ m}^2/\text{mol}$) ve výsledné reakční směsi o objemu 0.815 ml umístěné v 1 cm fotometrické kyvetě. Při kalibraci metody bylo zjištěno, že velikost $-\Delta A/\Delta t$ závisela lineárně na množství koenzymu (NAD^+ nebo NADH) do hodnoty 30 pmol. Přídavek 15 pmol odpovídal $-\Delta A/\Delta t = 0,1 \text{ min}^{-1}$. Ukažte, že podstatu stanovení představuje jednoenzymová recyklační reakce, při níž přítomné molekuly koenzymu opakovaně přecházejí mezi svou oxidovanou a redukovanou formou a odhadněte dobu potřebnou k uskutečnění jednoho cyklu.

Úloha 4

Malá množství koenzymu A (řádově 10^{-10} molu) lze stanovit pomocí fosfotransacetylasy (PTA) a citrát-synthasy (CS), které katalyzují reakce:



Potřebný oxalacetát se generuje z malátu působením malátdehydrogenasy:



a průběh sumární reakce proto lze sledovat měřením absorbance při vlnové délce 340 nm.

V navrženém optimalizovaném postupu reakční směs (2,15 ml) obsahuje 250 nkat PTA, 50 nkat CS, 350 nkat MDH a saturační koncentrace acetyl-fosfátu, malátu a NAD^+ . Za daných experimentálních podmínek má zdánlivá Michaelisova konstanta fosfotransacetylasy pro CoA hodnotu 0,5 mmol/l a K_M citrát-synthasy pro acetyl-CoA činí 50 $\mu\text{mol/l}$.

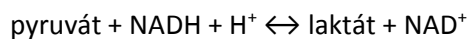
a) Vypočítejte, kolik molů NADH vznikne v reakční směsi za 15 minut po přidavku 1 nmolu CoA. Jakým přírůstkem absorbance v 1 cm kyvetě se to projeví, je-li absorpční koeficient NADH roven 622 m^2/mol ?

b) Jaký poměr koncentrací acetyl-CoA a CoA se ustaví v reakční směsi při recyklizaci?

c) Fosfotransacetylasa katalysuje i přenos fosfátové skupiny z acetyl-CoA na arsenát (AsO_4^-). Vzniklý acetylarsenát je nestálý a spontánně hydrolysuje na acetát za regenerace AsO_4^- . Ukažte, jak lze této nefyziologické aktivity využít k jednoenzymovému recyklizačnímu stanovení CoA.

Úloha 5

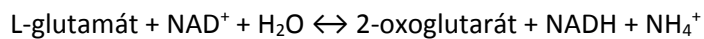
Enzymové stanovení pyruvátu resp. laktátu v krevním séru technikou "end-point" lze uskutečnit pomocí laktátdehydrogenasy. Rovnovážná konstanta katalysované reakce



se při teplotě 25 °C rovná $4,3 \cdot 10^{11}$ (mol/l). Při stanovení pyruvátu bylo k 0,6 ml pufru o pH 7,0 obsahujícího NADH (0,1 mmol/l) a laktátdehydrogenasu přidáno 0,4 ml krevního séra, v němž koncentrace pyruvátu a laktátu činily 50 μmol/l a 1 mmol/l. Rozhodněte, zda po ustavení rovnováhy bude alespoň 99% vneseného pyruvátu převedeno na laktát. Jakým způsobem je třeba modifikovat reakční podmínky při enzymovém stanovení laktátu?

Úloha 6

Enzymové stanovení L-glutamátu využívá reakce:



katalyzované glutamátdehydrogenasou. Při pH 9 a odčerpávání 2-oxoglutarátu reakcí s hydrazinem probíhá reakce kvantitativně směrem doprava. Analýza polévkového koření vycházela z navážky 16,5 mg vzorku, doplněné vodou na objem 100 ml. Po smísení 0,2 ml tohoto roztoku s 3,2 ml reakční směsi a 0,05 ml roztoku glutamát-dehydrogenasy vzrostla absorbance roztoku při 340 nm o 0,217 (v 1 cm kyvetě). Vypočtěte procentové zastoupení L-glutamátu v koření, má-li absorpční koeficient NADH $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ a M_r glutamátu se rovná 146.

Úloha 7

Při stanovení obsahu fruktosa-1-6-bisfosfátu v krysích játrech byl 1 g tkáně zhomogenisován ve zředěné kyselině chloristé na celkový objem 8,0 ml. Po neutralizaci 6,0 ml homogenátu 0,2 ml roztoku uhličitanu draselného a odstranění vyloučeného KClO_4 centrifugací byl objem 1,5 ml supernatantu smíchán s 1,5 ml pufru obsahujícího NADH a enzymy glycerolfosfátdehydrogenasu a triosafosfátisomerasu. Následoval přidavek malého objemu aldolasy a změření odpovídajícího poklesu absorbance při vlnové délce 340 nm, který činil 0,123. Vypočtete obsah fruktosa-1-6-bisfosfátu v játrech v jednotkách mol/g. Jaký význam má přítomnost triosafosfátisomerasy při stanovení?

Úloha 8

Z komerčního preparátu adenosin-5'-fosfosulfátu (APS) kontaminovaného 5'-AMP byl připraven roztok, jehož absorbance při 260 nm v 1 cm kyvetě činila 0,90. 0,9 ml tohoto roztoku bylo smícháno s 0,1 ml směsi obsahující nadbytek difosfátu, glukosy, NADP^+ , Mg^{2+} a enzymy ATP-sulfurylasu, hexokinasu a glukosa-6-fosfát-dehydrogenasu. V důsledku generování NADPH vzrostla absorbance při 340 nm o 0,262. Určete čistotu APS v %. Absorbční koeficient APS i AMP při 260 nm je roven $15400 \text{ cm}^2/\text{mmol}$, NADPH při 340 nm $6220 \text{ cm}^2/\text{mmol}$. ATP-sulfurylasa katalysuje reakci:
 $\text{APS} + \text{PP}_i \rightarrow \text{ATP} + \text{SO}_4^-$.

Úloha 9

Při enzymovém stanovení glukosy a fruktosy v umělém medu bylo 0,2 g vzorku rozpuštěno v destilované vodě a doplněno na 100 ml. 20 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 2,96 ml reakční směsi obsahující pufr, Mg^{2+} , nadbytek ATP a NADP^+ a enzym hexokinasy v kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Po konversi monosacharidů na fosfáty absorbance při vlnové délce 340 nm činila 0,038. Přídavkem 10 μl suspenze glukosa-6-fosfátdehydrogenasy se glukosa-6-fosfát přítomným NADP^+ kvantitativně oxidoval na 6-fosfoglukonát a absorbance vzrostla na 0,234. Po přidání 10 μl suspenze fosfoglukoisomerasy se absorbance postupně zvýšila až na 0,415. S použitím absorpčního koeficientu NADPH ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) určete procentové zastoupení glukosy a fruktosy v umělém medu. M_r obou cukrů činí 180,2.

Úloha 10

K 1,0 ml analyzovaného roztoku obsahujícího směs glukosa-6-fosfátu a glukosa-1-fosfátu byl přidán 1 ml pufru s nadbytkem NADP^+ , MgCl_2 a enzymem glukosa-6-fosfátdehydrogenasou. Absorbance vzniklého NADPH v 1 cm kyvetě činila 0,57. Po přidavku 1,0 ml roztoku fosfoglukomutasy se výsledná absorbance ustálila na hodnotě 0,50. Vypočtěte koncentrace obou glukosafosfátů ve vzorku (absorpční koeficient NADH je $6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$).