

INHIBICE ENZYMU

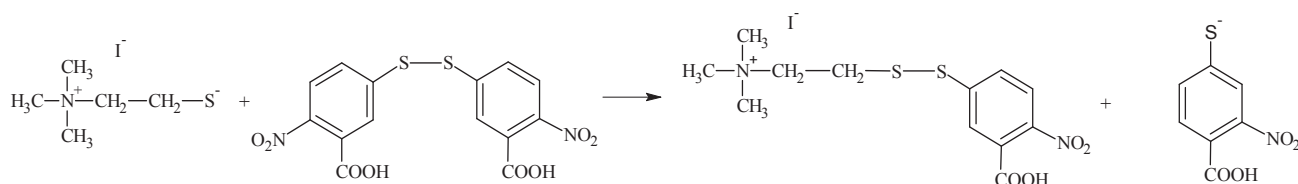
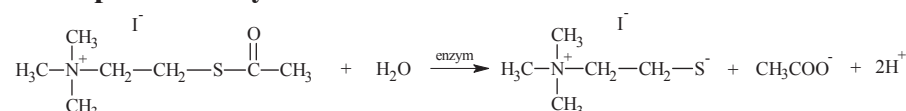
Úloha 1: Stanovení hodnoty IC₅₀ inhibitorů cholinesteráz

Princip:

Látky, které zpomalují enzymatické reakce se, nazývají inhibitory. Inhibiční účinnost těchto látek se stanovuje pomocí hodnoty IC₅₀, což je taková koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu (nebo také pokles aktivity enzymu na 50%).

Cholinesterázy jsou enzymy patřící do třídy hydroláz a štěpí estery cholinu.

Princip Ellmanovy reakce:



Roztoky a pomůcky:

roztoky inhibitorů o dané koncentraci

fosfátový pufr pH8

DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)

roztok enzymového preparátu (butyrylcholinesteráza)

acetylthiocholin jodid ($1 \cdot 10^{-3}$ M)

pístové mikropipety

zkumavky

stojánek na zkumavky

Postup:

Ze zásobního roztoku inhibitoru o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l připravte do 2 zkumavek (I, II) roztoky inhibitoru o koncentraci: $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ M (objem 2 ml). Dále si připravte 12 zkumavek a pipetujte dle tabulky a pokynů vyučujícího.



zk1	zk2	zk3	zk4	zk5	zk6	zk7	zk8	zk9	zk10	zk11	zk12 blank
inh.	inh.	inh.	inh.	inh.	inh.	inh.	inh.	inh.	inh.	----- -	-----
0,8 ml fosfátového pufru pH 8											
doplnit destilovanou vodou na objem 1,44 ml											
0,08 ml enzymového preparátu (BCHE), zkumavky protřepat, inkubovat 5 min při laboratorní teplotě											0,08 ml dest. vody
0,4 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)											
0,08 ml ATCH ($1 \cdot 10^{-3}$ M)											
zkumavky protřepat, inkubovat 10 min při laboratorní teplotě, změřit absorbanci A(412nm) proti blanku											

Vyhodnocení:

Ze zjištěných hodnot absorbance vypočítejte procenta blokování enzymu podle vztahu:

$$\% I = (1 - A_i/A_0) \times 100 \dots \dots \dots \% I - \text{procento inhibice}$$

A_i - absorbance roztoku obsahující inhibitor (zk. 1-10)

A_0 - absorbance roztoku, který neobsahuje inhibitor (zk. 11)

Zjištěná procenta inhibice vynesete do grafu proti molární koncentraci inhibitoru. Body proložte křivkou a odečtěte hodnotu c_i v místě, kde křivka protíná hodnotu 50% inhibice enzymu ($\% I = 50$).

Do závěru uveďte hodnotu IC_{50} daného inhibitoru.

Závěr:

