

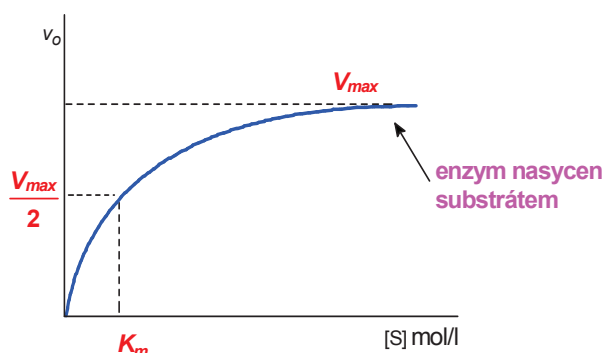
STANOVENÍ MICHAELISOVY KONSTANTY UREÁZY A KONCENTRACE MOČOVINY V NEZNÁMÉM VZORKU

Úloha 1: Stanovení Michaelisovy konstanty ureázy

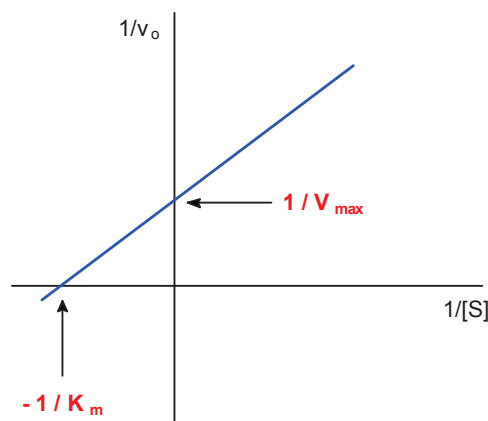
Princip:

Michaelisova konstanta je rovna koncentraci substrátu, jíž je zapotřebí, aby bylo při dané koncentraci enzymu dosaženo počáteční reakční rychlosti, která odpovídá polovině limitní rychlosti V_m . Čím je nižší, tím má enzym k danému substrátu vyšší afinitu. Má rozměr koncentrace, obvykle $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nezávisí na koncentraci enzymu, proto ji lze určit i pro nepřečištěné enzymové preparáty či dokonce tkáňové řezy nebo jiné biologické struktury, obsahující studovaný enzym.

Saturační křivka



Linearizace Lineweaver-Burk



Rovnice Michaelis-Mentenové

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_M}{V_m \cdot [S]}$$

Roztoky a pomůcky:

roztok močoviny (100 mmol/l)
pracovní roztok (roztok enzymu v pufru)
pístové mikropipety
odměrné baňky
zkumavky
stojánek na zkumavky

Postup:

Připravte si zásobní roztok močoviny o koncentraci 100 mmol/l odvážením 1,5014 g močoviny do 250ml odměrné baňky. Mol. hmotnost močoviny je 60,056.



Do deseti odměrných baněk o objemu 50 ml odpipetujte odpovídající množství zásobního roztoku močoviny o koncentraci 100 mmol/l tak, aby výsledné koncentrace močoviny v jednotlivých bankách byly: 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 a 90 mmol/l.

Do zkumavky odpipetujte 1 ml pracovního roztoku (roztok enzymu v pufru) a v čase $t = 0$ přidejte 10 μ l roztoku močoviny o známé koncentraci. Promíchejte a vlijete do kyety. V 20 sekundových intervalech měřte úbytek absorbance při $\lambda = 350$ nm po dobu 3 min proti blanku (dest. voda).

Ze závislosti absorbance na čase vypočtete reakční rychlost podle vzorce:

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Reciproké hodnoty reakčních rychlostí vynesete do grafu proti reciprokým hodnotám koncentrace substrátu v reakční směsi a určete hodnotu Michaelisovy konstanty (K_M) a mezní rychlosti (V_m).

Úloha 2: Stanovení obsahu močoviny v neznámém vzorku

Postup:

Do zkumavky odpipetujete 1 ml pracovního roztoku a v čase $t = 0$ přidejte 10 μ l vzorku. Zamíchejte a vlijete do kyvety. Po 20 sekundách měřte úbytek absorbance při $\lambda = 350$ nm a to po dobu 3 minut proti blanku (dest. voda).

Vypočtete úbytek absorbance vzorku a standardu o známé koncentraci močoviny v mmol/l za stejný časový úsek a z následujícího vzorce vypočtete koncentraci močoviny v neznámém vzorku:

$$c = (\Delta A_{\text{vzorek}} / \Delta A_{\text{standard}}) * c_s$$

Závěr:

$K_M =$

$V_m =$

c (vz.) =

