

jména:	
obor:	
neznámý vzorek močoviny pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)	

přílohy protokolu: graf (kalibrační přímka pro stanovení koncentrace amonných iontů Nesslerovým činidlem), graf (stanovení počátečních rychlostí alkoholdehydrogenasové reakce pro různé substráty)

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Ureasová reakce, princip stanovení koncentrace močoviny. Alkoholdehydrogenasová reakce, Warburgův test. Chemické výpočty.

Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).

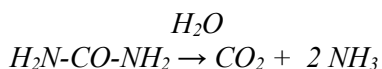
Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): jen část A.

Učiteléské kombinace (čtyřhodinová cvičení): části A, B.

PRINCIP ÚLOHY

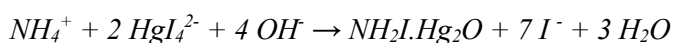
A. Stanovení koncentrace močoviny pomocí ureasy

Ureasa (karbamid-amido-hydrolasa) je substrátově vysoce specifický enzym katalyzující hydrolytický rozklad močoviny za vzniku oxidu uhličitého a amoniaku:



Ureasa se vyskytuje v rostlinách a mikroorganismech, u vyšších živočichů nebyla nalezena. Pomocí ureasou katalyzované reakce lze stanovit množství **močoviny** ve vzorku jako množství vznikajícího **amoniaku**. Podmínkou je, aby reakce probíhala dostatečně dlouhou dobu tak, aby byla veškerá močovina přeměněna na amoniak. Pro stanovení koncentrace močoviny v neznámém vzorku je ovšem nejprve nutné zjistit jaký je stupeň konverze močoviny v reakci.

Amoniak uvolněný ureasovou reakcí lze stanovit buďto titračně, anebo fotometricky po jeho reakci s Nesslerovým činidlem (tetrajodortu'natanem):



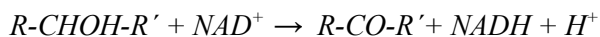
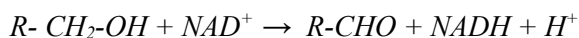
Vzniklý reakční produkt má absorpční maximum při vlnové délce 436 nm. Jako standard pro stanovení koncentrace amonných iontů lze použít siran amonný, který poskytuje dva amonné ionty stejně jako rozklad močoviny, stechiometrie je tedy 1:1.

Stanovení koncentrace močoviny v tělních tekutinách má význam pro posouzení funkce ledvin (denní produkce močoviny u člověka je 20 - 25 g). U zdravého jedince je koncentrace močoviny v krevním séru v rozmezí 2,5 - 8,3 mmol/l.

Stanovujeme-li aktivitu enzymu, je potřeba pracovat za podmínek nasycení enzymu substrátem – v reakční směsi musí být nadbytek substrátu. V opačném případě, kdy stanovujeme množství substrátu, je naopak vhodnější pracovat za podmínek nadbytku enzymu v reakční směsi – urychlí se tak průběh konverze stanovovaného substrátu na produkt.

B. Substrátová specifita alkoholdehydrogenasy

Alkoholdehydrogenasa (alkohol : NAD⁺-oxidoreduktasa) katalyzuje vratnou oxidaci primárních a sekundárních alkoholů na aldehydy, resp. ketony:



Enzym se vyskytuje např. v rostlinách, v kvasinkách nebo u vyšších živočichů, kde se podílí se na odbourávání zkonsumovaného ethanolu a přeměně 11-*cis*-retinolu na 11-*cis*-retinal resp. *trans*-retinalu na *trans*-retinol při biochemických reakcích v procesu vidění. Enzymy z různých zdrojů se liší svojí strukturou a molekulovou hmotností (např. savčí jaterní alkoholdehydrogenasa je dimer s molekulovou hmotností 80 000, kvasničná alkoholdehydrogenasa je tetramer s molekulovou hmotností asi 150 000), v aktivním centru obsahují zinek.

NADH vzniklý alkoholdehydrogenasovou reakcí lze stanovit tzv. **Warburgovým optickým testem** – měřením absorbance vzorku při vlnové délce 340 nm.

Oxidovaný koenzym NAD⁺ jako látka aromatického charakteru výrazně absorbuje UV záření s absorpčním maximem při vlnové délce 260 nm. Redukovaný koenzym NADH nemá charakter aromatické sloučeniny, získává chinoidní strukturu, která vykazuje zmenšenou absorpci světla při vlnové délce 260 nm, avšak výrazné absorpční maximum při vlnové délce 340 nm, kde oxidovaná forma koenzymu NAD⁺ neabsorbuje vůbec.

Alkoholdehydrogenasa patří mezi enzymy se širokou substrátovou specifitou, je jen skupinově specifická, oxiduje různé alkoholy a redukuje odpovídající aldehydy nebo ketony. Stanovením počáteční rychlosti enzymové reakce lze (při stejných koncentracích substrátů) zjistit, který z nich je přirozeným substrátem enzymu.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Stanovení koncentrace močoviny pomocí ureasy

Materiál a vybavení:

standardní roztok síranu amonného ($0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$)
standardní roztok močoviny (20 mmol.l^{-1})
roztok močoviny o neznámé koncentraci
 $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ fosfátový pufr pH 7,0
ureasa - 1 % roztok v 30 % ethanolu
Nesslerovo činidlo (roztok tetrajodortuřnatanu draselného v hydroxidu sodném)
zkumavky, pipety, dávkovače, stopky, temperovaná vodní lázeň, fotometr

Nesslerovo činidlo je toxické - pracujte se zvýšenou opatrností!

Postup:

Sestrojení kalibrační závislosti pro stanovení koncentrace amoniaku: Nachystejte si sadu 6 zkumavek, které důkladně vypláchnete destilovanou vodou. Podle tabulky připravte sadu šesti roztoků o celkovém objemu 5 ml a známé koncentraci síranu amonného k sestavení kalibrační přímky (zkumavky 1-6). Zkumavka č. 1 síran amonný neobsahuje, proto se použije jako slepý vzorek.

zkumavka č.	pipetovaný objem		vypočtená $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ [mmol.l ⁻¹]	vypočtená $c(\text{NH}_4^+)$ [mmol.l ⁻¹]	A_{436}
	0,1 mmol.l ⁻¹ roztok (NH ₄) ₂ SO ₄ [ml]	destil. voda [ml]			
1	0,0	5,0	0,00	0,00	0,000
2	1,0	4,0			
3	2,0	3,0			
4	3,0	2,0			
5	4,0	1,0			
6	5,0	0,0			

Do všech zkumavek přidejte dávkovačem 0,2 ml Nesslerova činidla. Obsah zkumavek promíchejte na vortexu a po 10 minutách stání při laboratorní teplotě změřte absorbanci vzorků při vlnové délce 436 nm proti slepému vzorku č. 1 (roztoky po měření vračejte do zkumavek) a výsledky zapište do tabulky. Přesáhne-li absorbance některého z roztoků hodnotu 0,8 (nad touto hodnotou již není závislost absorbance na koncentraci lineární – neplatí Lambert-Beerův zákon) připravte příslušný roztok znovu, případně bod z kalibrace vynechte.

Stanovení koncentrace močoviny ureasovou reakcí: Do jedné zkumavky pipetujte 2 ml standardního roztoku močoviny a 1 ml fosfátového pufru a do druhé zkumavky 2 ml neznámého vzorku močoviny a 1 ml fosfátového pufru. Zkumavky označte a nechejte vytemperovat v termostatu na teplotu 30 °C. Poté v nich startujte enzymovou reakci přidávkem 1 ml roztoku ureasy, směs důkladně promíchejte na vortexu a vraťte do termostatu.

Připravte sadu 6 označených zkumavek – napipetujte do každé 0,2 ml Nesslerova činidla.

Po 30 minutách proveďte odběry vzorků ze zkumavek v termostatu: reakční směs ve zkumavkách promíchejte na vortexu a odpipetujte po 50 μl směsi do zkumavek s Nesslerovým činidlem (ukončí enzymovou reakci) – ze vzorku obsahujícího standardní roztok močoviny i ze vzorku obsahující neznámý vzorek močoviny proveďte 3 paralelní odběry. Vzorky promíchejte, po 10 minutách stání při laboratorní teplotě k nim přidejte 4,95 ml vody (co nejpřesněji – zdroj chyb) a změřte absorbanci vzorků při vlnové délce 436 nm proti slepému vzorku (slepý vzorek připravte smícháním 5 ml vody a 0,2 ml Nesslerova činidla).

Úloha 10 – Analytické využití enzymů - enzymové stanovení metabolitů
 Substrátová specifita alkoholdehydrogenasy
 Praktická část A. Stanovení koncentrace močoviny pomocí ureasy

zkumavka č.	0,05 ml vzorku	A_{436}			$\bar{\sigma} A_{436}$
1, 2, 3	standard				
4, 5, 6	neznámý vzorek				

Vyhodnocení:

Srovnáním absorbance standardního a neznámého vzorku (s oběma vzorky se pracovalo stejným postupem) vypočtete koncentraci močoviny v neznámém vzorku (v obou případech předpokládejte stejné % konverze močoviny – tedy ho při výpočtu neberte v úvahu):

c = mmol.l⁻¹

Vypočítejte koncentrace síranu amonného a amonných iontů ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky v části Postup. Sestrojte kalibrační graf (závislost A_{436} na koncentraci amonných iontů ve zkumavce).

Vypočítejte teoretickou koncentraci amonných iontů v reakční směsi obsahující standardní vzorek močoviny na konci reakce v případě 100 % konverze močoviny na amoniak (vezměte v úvahu stechiometrii ureasové reakce): **c = mmol.l⁻¹**

Dále vypočítejte teoretickou koncentraci amonných iontů ve vzorku, který vznikl zředěním reakční směsi obsahující standardní vzorek močoviny vodou – před přidáním Nesslerova činidla: **c = mmol.l⁻¹**

Z kalibrační závislosti pro stanovení koncentrace amonných iontů zjistěte absorbanci (A_{436}) odpovídající této koncentraci amonných iontů: **$A_{436} =$**

Srovnáním absorbance standardního vzorku močoviny s hodnotou absorbance odpovídající 100 % konverzi močoviny vypočtete skutečné % konverze močoviny:

konverze močoviny (%):

PRAKTICKÁ ČÁST B. Substrátová specifita alkoholdehydrogenasy

Materiál a vybavení:

0,3 mol/l methanol, ethanol, propanol, butanol

15 mmol/l NAD⁺

0,1 mol/l glycinový pufr pH 10,0

alkoholdehydrogenasa (komerční preparát zředěný roztokem BSA)

zkumavky, pipety, dávkovače, míchadélko, fotometr s UV lampou, skleněné kyvety, stopky, termostat

Postup:

Glycinový pufr vytemperujte na teplotu 30 °C. Přímo do fotometrické kyvety pro UV oblast pipetujte 2,5 ml glycinového pufru, 0,3 ml roztoku NAD⁺ a 5 µl preparátu alkoholdehydrogenasy (špičku s roztokem alkoholdehydrogenasy nejprve opatrně otřete o okraj plastové zkumavky, špičku ponořte do roztoku v kyvetě a sledujte, zda jste ze špičky vytlačili celý objem 5 µl preparátu alkoholdehydrogenasy). Kyvetu vložte do fotometru, hodnotu absorbance při vlnové délce 340 nm seřídte na nulu. Přidejte do kyvety 0,2 ml roztoku jednoho z alkoholů (v pořadí: ethanol, propanol, butanol, methanol), vzorek zamíchejte míchadlem a ihned spusťte záznam fotometru. Registrujte hodnoty absorbancí v intervalech 20 sekund po dobu 3 minut.

POZOR! Alkoholdehydrogenasa je nestabilní, nechystejte proto vzorky pro měření s předstihem.

Veškeré stanovení je extrémně citlivé na čistotu. Nezaměňujte špičky, po každém měření vypláchněte kyvetu opakovaně destilovanou vodou a opláchněte míchadlo.

Vyhodnocení:

($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

substrát	ethanol					propanol				
	A ₃₄₀	c (NADH) [mmol/l]	c (NADH) [nmol/l]	dc* (NADH) [nmol/l]	v [nmol.l ⁻¹ .s ⁻¹]	A ₃₄₀	c (NADH) [mmol/l]	c (NADH) [nmol/l]	dc* (NADH) [nmol/l]	v [nmol.l ⁻¹ .s ⁻¹]
20										
40										
60										
80										
100										
120										
140										
160										
180										

substrát	butanol					methanol				
	A ₃₄₀	c (NADH) [mmol/l]	c (NADH) [nmol/l]	dc* (NADH) [nmol/l]	v [nmol.l ⁻¹ .s ⁻¹]	A ₃₄₀	c (NADH) [mmol/l]	c (NADH) [nmol/l]	dc* (NADH) [nmol/l]	v [nmol.l ⁻¹ .s ⁻¹]
20										
40										
60										
80										
100										
120										
140										
160										
180										

*změna koncentrace v časovém intervalu 20 s

Vypočítejte reakční rychlost v jednotlivých dvacetisekundových intervalech. Do (společného) grafu vynesete závislost *reakční rychlosti na celkové době reakce* (pro různé substráty). Závislosti extrapolujte k nulovému času a na ose y odečtete hodnoty počátečních reakčních rychlostí. Do tabulky uveďte zjištěné hodnoty počáteční reakční rychlosti v_0 pro různé substráty alkoholdehydrogenasy:

substrát	R- =	v_0 [nmol.l ⁻¹ .s ⁻¹]
methanol	H-	
ethanol	CH ₃ -	
propanol	CH ₃ CH ₂ -	
butanol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	

Uveďte, který ze substrátů je alkoholdehydrogenasou nejrychleji přeměňován a lze jej tedy považovat za její přirozený substrát:

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	
neznámý vzorek močoviny pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)	

ÚLOHA 10A

zkumavka č.	A ₄₃₆
1	0,000
2	
3	
4	
5	
6	

podpis vedoucího cvičení:

zkumavka č.	0,1 ml vzorku	A ₄₃₆		
1, 2, 3	standard			
4, 5, 6	neznámý vzorek			

podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 10B

substrát	ethanol	propanol	butanol	methanol
doba reakce t [s]	A ₃₄₀	A ₃₄₀	A ₃₄₀	A ₃₄₀
20				
40				
60				
80				
100				
120				
140				
160				
180				

podpis vedoucího cvičení: