

jména:	
obor:	datum provedení:

přílohy protokolu: 3 x graf: stanovení počáteční rychlosti metodou tečny, stanovení počáteční rychlosti metodou extrapolace reakční rychlosti k nulovému času, závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci enzymu

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

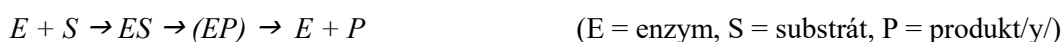
Trypsinová reakce, princip měření trypsinové aktivity s použitím přirozeného substrátu. Rychlost enzymové reakce, počáteční rychlost enzymové reakce, jednotky rychlosti enzymové reakce, aktivita enzymu, jednotky enzymové aktivity, specifická aktivita enzymu, jednotky specifické aktivity enzymu, molekulární aktivita enzymu, jednotky molekulární enzymové aktivity. Lambertův-Beerův zákon. Chemické výpočty.

PRINCIP ÚLOHY

A. Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce.

Rychlost enzymových reakcí je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí, množství enzymu v reakční směsi, přítomnosti efektorů (modifikátorů) a také na koncentraci substrátů.

Jedno-substrátové reakce probíhají podle obecného schématu:



Při konstantní koncentraci enzymu je počáteční rychlost jedno-substrátové enzymové reakce v_0 ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) závislá na koncentraci substrátu $[S]$ ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) podle **rovnice Michaelise a Mentenové**:

$$v_0 = \frac{v_{\text{lim}} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

kde v_{lim} [$\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$] je **limitní (maximální) rychlost reakce** a K_M [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] je **Michaelisova konstanta**. K_M je základní kinetickou konstantou, která je za určitých podmínek (pH, teplota, složení reakční směsi atd.) **typická pro každou dvojici enzym – substrát**. Při koncentraci substrátu $[S] = K_M$ je reakční rychlost rovna polovině limitní (maximální) rychlosti:

$$v_0 = \frac{v_{\text{lim}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \xrightarrow{K_M=[S]} v_0 = \frac{v_{\text{lim}} \cdot [S]}{2 [S]} = \frac{v_{\text{lim}}}{2}$$

Enzym s **malou** hodnotou K_M tedy dosahuje **maximálního** katalytického účinku při **nízkých** koncentracích substrátu.

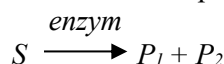
Ačkoliv je pro studium enzymové kinetiky znalost v_{lim} [$\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$] a K_M [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] důležitá, v dnešním cvičení se omejdeme bez experimentálního stanovení těchto parametrů a stanovíme si pouze počáteční rychlost enzymové reakce.

Rychlost reakce je definována jako změna koncentrace látky c (mol.l^{-1}) za časovou jednotku t (s):
 v [$\text{mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$] = dc/dt

Pokud máme definovaný objem (objem se během reakce nemění), lze vyjádřit rychlost enzymové reakce v čase t (s):

$$v$$
 [mol.s^{-1}] = dn/dt

Jako jednoduchý příklad budeme uvažovat enzymovou reakci, při níž se jeden substrát štěpí enzymem za vzniku dvou produktů:



Rychlost této reakce lze stanovit buď jako úbytek látkového množství substrátu S v čase t ($v_{\Delta S} = dS/dt$), anebo jako přírůstek látkového množství některého z produktů P_1 , P_2 v čase t ($v_{\Delta P} = dP_1/dt = dP_2/dt = dP/dt$). Pro reakci s uvažovanou stechiometrií platí: $v_{\Delta S} = v_{\Delta P}$.

Rychlost enzymové reakce, do níž vstupuje pouze jeden substrát, je úměrná koncentraci substrátu, to znamená, že reakce probíhá podle kinetiky reakce prvního řádu. V průběhu reakce prvního řádu se s postupným poklesem koncentrace substrátu úměrně snižuje i rychlost reakce.

Podle kinetiky reakce prvního řádu probíhají také reakce, kterých se účastní více reagujících složek, avšak všechny kromě jedné jsou v reakčním prostředí ve značném nadbytku a jejich koncentrace se tedy během reakce prakticky nemění. Jsou to např. i hydrolytické reakce, kde je jednou z reagujících složek voda ($A + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{B-H} + \text{C-OH}$), jejíž koncentraci lze vzhledem k velkému nadbytku v roztoku (koncentrace vody je $55,6 \text{ mol.l}^{-1}$) považovat za konstantní.

Je-li koncentrace substrátu vysoká a množství enzymu malé, pak může být reakční rychlost limitována množstvím enzymu a na koncentraci substrátu nezávisí. V takovém případě je množství přeměněného substrátu za časovou jednotku konstantní a reakční rychlost se v čase nemění – reakce probíhá podle kinetiky reakce nultého řádu.

Komplikace s proměnlivým řádem reakce lze eliminovat, jestliže je enzymová reakce charakterizována pomocí **počáteční rychlosti** v_0 ($v_{0\Delta S} = [dS/dt]_{t=0}$, $v_{0\Delta P} = [dP/dt]_{t=0}$). Na počátku reakce je v reakční směsi přítomen substrát v původní koncentraci, není přítomen reakční produkt, reakce probíhá počáteční (za daných podmínek maximální) rychlostí, koncentrace produktu roste v závislosti na čase **lineárně** a rychlost eventuální vratné reakce je zanedbatelná. Počáteční rychlostí může enzymová reakce ve skutečnosti probíhat po určitou krátkou dobu, je-li substrát v nadbytku a jeho koncentrace v reakční směsi se tedy výrazně nemění, a je-li v reakční směsi zanedbatelná koncentrace produktu (vzhledem ke koncentraci substrátu).

Počáteční rychlost enzymové reakce lze zjistit několika způsoby:

I. výpočtem

- je-li závislost úbytku množství substrátu nebo přírůstku množství produktu na čase po dobu průběhu reakce skutečně lineární, pak $v_{0\Delta S} = \Delta S/\Delta t$, $v_{0\Delta P} = \Delta P/\Delta t$

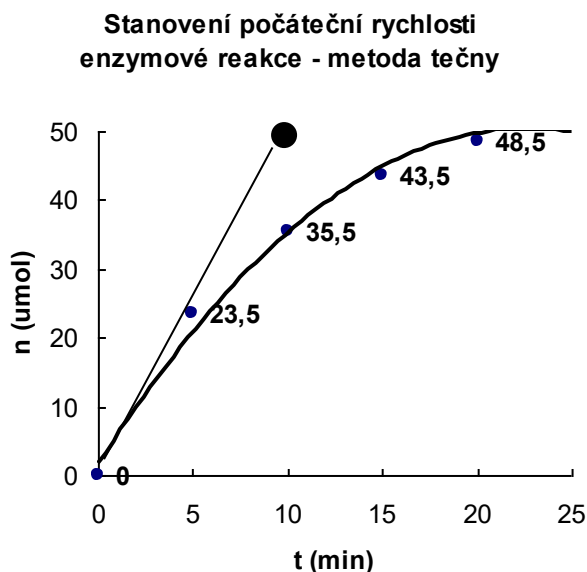
II. metodou tečny

- reakční rychlost lze zjistit jako směrnici tečny (s počátkem v čase 0) nelineární závislosti úbytku látkového množství substrátu nebo přírůstku látkového množství produktu na čase (**obrázek 1**)

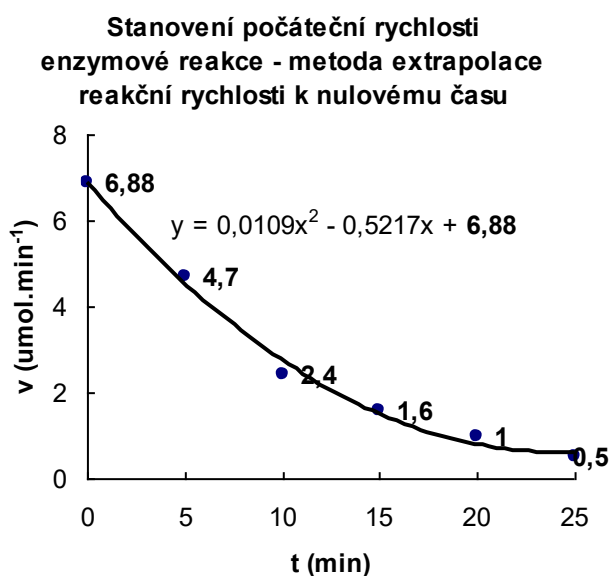
III. metodou extrapolace reakční rychlosti k nulovému času

- **obrázek 2**

V praxi se obvykle, je-li k dispozici vhodná analytická metoda, měří v závislosti na čase přírůstek produktu. Pokud by se měřil úbytek substrátu, je zřejmé, že by musel být signifikantní a nebyla by tedy dodržena podmínka přibližně konstantní koncentrace substrátu po celou dobu reakce v reakční směsi.



Obrázek 1. K nelineární závislosti *látkového množství vzniklého produktu na době reakce* byla sestrojena tečna s počátkem v čase 0. Směrnice tečny (přímky) udává počáteční rychlost reakce v_0 [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$]. Pro příklad zde je směrnice cca $50/10 = 5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Metoda tečny bývá zatížena subjektivní chybou při sestrojování tečny manuálním způsobem. Tečnu lze však vygenerovat i v příslušných programech (např. Excel).



Obrázek 2. V pětiminutových intervalech byla vypočítána rychlost reakce jako podíl vzniklého látkového množství produktu v daném časovém intervalu a doby reakce (5 minut). Do grafu byla vynesena závislost *reakční rychlosti na celkové době reakce* a extrapolována k nulovému času tak, že závislostí byla proložena polynomičká křivka a zobrazena rovnice regrese, jejíž poslední člen udává velikost úseku na ose y (hodnotu počáteční rychlosti enzymové reakce).

B. Aktivita enzymu, molekulární aktivita enzymu.

Je-li v reakční směsi dostatečný nadbytek substrátu, probíhá enzymová reakce podle kinetiky nultého řádu (rychlost je **nezávislá** na koncentraci substrátu), přičemž rychlost reakce je přímo úměrná koncentraci enzymu:

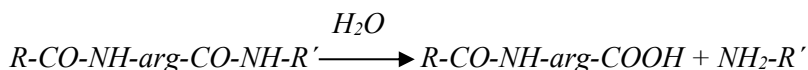
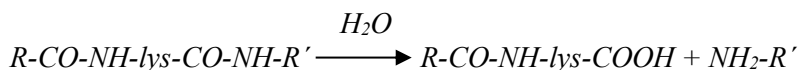
$$v [\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}] = k \cdot [\text{E}]$$

Pomocí rychlosti enzymové reakce lze nepřímo vyjádřit množství enzymu v reakční směsi jako **aktivitu enzymu** na základě jeho schopnosti katalyzovat přeměnu substrátu na produkt. Jednotky enzymové aktivity tedy mají stejný fyzikální rozměr jako rychlost enzymové reakce. Aktivita se udává v jednotce **1 katal (kat) = mol/s**.

V praxi se toto nepřímé vyjádření běžně používá namísto přímého určení koncentrace enzymu např. jako molární nebo hmotnostní koncentrace, neboť stanovit látkové množství nebo hmotnost enzymu obsaženého v biologickém materiálu je velmi obtížné. Podmínkou správného stanovení aktivity enzymu je jeho saturace substrátem po celou dobu reakce a optimální reakční podmínky.

Je-li známa molární koncentraci enzymu [E], lze z rychlosti enzymové reakce v vypočítat rychlostní konstantu k . Tato konstanta udává **molekulární aktivitu enzymu (katalytická konstanta, číslo přeměny)** [s^{-1} , min^{-1}], což je počet molekul (molů) substrátu přeměněných jednou molekulou (molem) enzymu za časovou jednotku. Vysoké číslo přeměny znamená, že katalyzovaná reakce probíhá vysokou rychlostí.

Trypsin patří mezi serinové proteasy a jeho relativní molekulová hmotnost trypsinu je cca **23,3 kDa**. Trypsin hydrolyzuje peptidovou vazbu bílkovin v místě **karboxylových** skupin zbytků **lysinu** a **argininu**:



Jako přirozené substráty trypsinu bývají používány běžné bílkoviny (kasein, želatina, hemoglobin, albumin).

Počáteční rychlost trypsinové reakce bude v úloze stanovena s použitím želatiny, kdy bude rychlost štěpení bílkoviny trypsinem sledována titračně stanovením množství volných karboxylových skupin peptidových řetězců zakončených zbytky lysinu nebo argininu (princip neutralizační titrace volných karboxylových skupin aminokyselin nebo peptidů vizte úloha 3 - část C, tzv. formolová titrace).

Titrační metoda nedává v případě bílkovinných hydrolyzátů zcela spolehlivé výsledky, neboť nelze přesně určit reakční stechiometrii: spotřebu titračního činidla ovlivňuje přítomnost funkčních skupin některých aminokyselin ve zbytcích polypeptidických řetězců – spotřebu snižují ϵ -aminoskupiny lysinu a argininu, a naopak spotřebu zvyšují karboxylové skupiny v bočních řetězcích kyseliny asparagové a glutamové nebo fenolická skupina tyrosinu.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce.

Materiál a vybavení:

preparát trypsinu (trypsin byl připraven jako **0,2% roztok**)
5 % želatina (vodný roztok)
40 % formaldehyd
0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný
0,02 mol.l⁻¹ hydroxid sodný
1 % roztok fenolftaleinu v ethanolu
odměrné válce, kádinky, Pasterovy pipety, titrační baňky, byreta 25 ml, pipety, termostat, stopky

Postup:

V kádince smíchejte 75 ml 40% formaldehydu a 150 ml vody (neutralizovaný zředěný roztok formaldehydu), do další kádinky odměřte 30 ml enzymového preparátu a dále si nachystejte baňku s předpřipraveným roztokem želatiny o objemu **120 ml**. Do všech roztoků přidejte 0,5 ml roztoku fenolftaleinu a také 0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný do slabě růžového zbarvení. Poté roztoky želatiny a trypsinu vytemperujte na teplotu 37 °C. Následně pipetujte neutralizovaný roztok formaldehydu do titračních baněk – připravte sadu 14 titračních baněk obsahujících 15 ml neutralizovaného roztoku formaldehydu.

Formaldehyd je látka zdraví silně škodlivá, při zacházení s ním dodržujte všechna bezpečnostní a hygienická pravidla!

Smíchejte připravené vytemperované roztoky želatiny a trypsinu, směs promíchejte, zapněte stopky a ihned odeberte dvakrát 10 ml směsi do dvou titračních baněk obsahujících neutralizovaný zředěný formaldehyd (odběr vzorků v čase 0 - slepý vzorek). Ihned po odebrání 10 ml alikvotů vraťte reakční směs zpět do termostatu na 37 °C. Poté oba vzorky titrujte 0,02 mol.l⁻¹ hydroxidem sodným do trvale růžového zbarvení.

Další vzorky (vždy dva paralelní vzorky) odebírejte z temperované reakční směsi 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minut po zahájení enzymové reakce do titračních baněk obsahujících neutralizovaný zředěný formaldehyd a titrujte stejným způsobem. Nezapomeňte ihned po odebrání alikvot vrátit reakční směs zpět do termostatu na 37 °C.

doba reakce t [min]	0	5	10	15	20	25	30
spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]							
průměrná spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]							
průměrná spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH po odečtení spotřeby slepého vzorku [ml]*							
látkové množství spotřebovaného 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [μmol]							
látkové množství volných –COOH skupin v 10 ml reakční směsi [μmol]							
látkové množství volných –COOH skupin v 1 ml reakční směsi [μmol]							
přírůstek látkového množství volných –COOH skupin v daném časovém intervalu (5 min) v 1 ml reakční směsi [μmol]							
reakční rychlost v daném časovém intervalu (5 min) v 1 ml reakční směsi [μmol.min ⁻¹]							

* další výpočty již po odečtení spotřeby slepého vzorku

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku obsahující experimentální údaje (spotřeba hydroxidu sodného při jednotlivých titracích) a vypočtené údaje.

převažující stechiometrie formolové titrace:

I.

Vypočítejte **počáteční** rychlost trypsinové reakce jako podíl látkového množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi a doby reakce pro prvních 5 minut reakce.

II.

Do grafu vyneste závislost *látkového množství volných skupin – COOH v 1 ml reakční směsi na čase* a k závislosti sestrojte **tečnu** s počátkem v čase 0. Ze směrnice tečny vypočítejte počáteční rychlost trypsinové reakce jako rychlost vzniku volných skupin –COOH.

III.

Vypočítejte látkové množství produktu (v 1 ml reakční směsi) v dalších pětiminutových intervalech a reakční rychlost v těchto intervalech. Do grafu vyneste *závislost reakční rychlosti na celkové době reakce*. Závislost **extrapolujte** k nulovému času a na ose *y* odečtěte hodnotu počáteční reakční rychlosti trypsinové reakce jako rychlosti vzniku volných skupin –COOH.

Hodnoty počáteční rychlosti trypsinové reakce stanovené různými postupy zpracování výsledků uveďte **do tabulky** na konci části Vyhodnocení.

Vypočítejte *hmotnost čistého trypsinu v mg obsaženého v 1 ml reakční směsi*, všechny výpočty uveďte do protokolu:

Uveďte počáteční rychlost reakce vztaženou na 1 mg čistého trypsinu, údaje uveďte do tabulky níže.

v_0^* vypočtená	$[\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}]$	$[\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}]$
jako $\Delta P/\Delta t$ pro prvních 5 min reakce		
ze směrnice tečny závislosti P na dt		
z extrapolované hodnoty v_0 závislosti v na dt		

* na ml reakční směsi

PRAKTICKÁ ČÁST B. Aktivita enzymu, molekulární aktivita enzymu.

Materiál a vybavení:

preparát trypsinu (trypsin byl připraven jako **0,2% roztok**)

5 % želatina (vodný roztok)

40 % formaldehyd

0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný

0,02 mol.l⁻¹ hydroxid sodný

1 % roztok fenolftaleinu v ethanolu

odměrné válce, kádinky, Pasterovy pipety, titrační baňky, byreta 25 ml, pipety, termostat, stopky

Postup:

Smíchejte v kádince 50 ml 40 % formaldehydu a 100 ml vody (neutralizovaný zředěný roztok formaldehydu), do další kádinky odměřte 20 ml enzymového preparátu a dále si nachystejte baňku s předpřipraveným roztokem želatiny o objemu **80 ml**. Do všech roztoků přidejte 0,5 ml roztoku fenolftaleinu a také 0,2 mol.l⁻¹ hydroxid sodný do slabě růžového zbarvení. Roztoky želatiny a trypsinu vytemperujte na teplotu 37 °C. Neutralizovaný roztok formaldehydu pipetujte do titračních baněk – připravte sadu 10 titračních baněk obsahujících 15 ml připraveného neutralizovaného roztoku formaldehydu.

Formaldehyd je látka zdraví silně škodlivá, při zacházení s ním dodržujte všechna bezpečnostní a hygienická pravidla!

Následně 5 minut temperujte dvojici prázdných titračních baněk na 37 °C, do kterých poté přidejte 8 ml roztoku želatiny a 2 ml vody. Vzorky promíchejte, vložte zpět do termostatu na 37 °C, zapněte stopky a **přesně po 5 minutách** obsah baněk přelijte do dvou titračních baněk obsahujících formaldehyd. Vzorky titrujte 0,02 mol.l⁻¹ hydroxidem sodným do trvale růžového zbarvení. Spotřebu hydroxidu zaznamenejte do prvního sloupce v tabulce níže – jednalo se o dvojici slepých vzorků bez přítomnosti enzymového preparátu.

Další reakce proveďte stejným způsobem podle rozpisu objemů v tabulce níže – vždy do dvojice prázdných titračních baněk přidejte 8 ml želatiny a poté objemy enzymového preparátu a vody dle tabulky. Následně vložte baňky do termostatu na 37 °C, zapněte stopky a **přesně po 5 minutách** obsah baněk přelijte do dvou titračních baněk obsahujících formaldehyd. Poté vzorky titrujte 0,02 mol.l⁻¹ hydroxidem sodným do trvale růžového zbarvení.

pipetovaný objem enzymového preparátu [ml]	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
pipetovaný objem vody [ml]	2,0	1,5	1,0	0,5	0,0
spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]					
průměrná spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]					
průměrná spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH po odečtení spotřeby slepého vzorku [ml]					
látkové množství spotřebovaného 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [μmol]*					
látkové množství volných skupin -COOH v 10 ml reakční směsi [μmol]					
látkové množství volných skupin -COOH v 1 ml reakční směsi [μmol]					
aktivita enzymu v 1 ml reakční směsi [μmol.min ⁻¹]					
aktivita enzymu v 1 ml reakční směsi [nkat]					

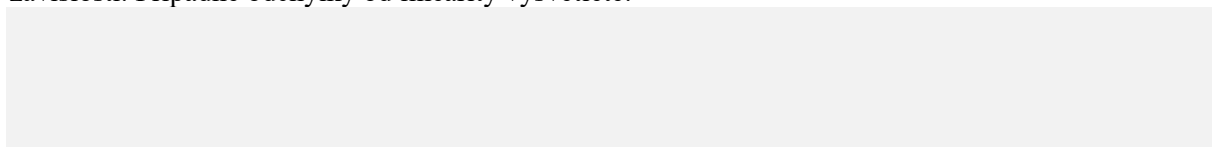
*další výpočty již po odečtení spotřeby slepého vzorku

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku obsahující experimentální údaje (spotřeba hydroxidu sodného při jednotlivých titracích) a vypočtené údaje.

převažující stechiometrie formolové titrace:

Aktivitu trypsinu vypočítejte jako poměr přírůstku látkového množství volných skupin – COOH v 1 ml reakční směsi a doby reakce. Dále vypočítejte hmotnostní a molární koncentraci enzymu v reakční směsi, doplňte údaje v následující tabulce a sestrojte graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci enzymu v reakční směsi. Molekulární aktivitu enzymu počítejte pouze pro lineární oblast závislosti. Případné odchylky od linearity vysvětlete:



pipetovaný objem enzymového preparátu [ml]	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
koncentrace trypsinu v reakční směsi [mg.ml ⁻¹]	0,0				
hmotnost trypsinu obsaženého v 1 ml reakční směsi [mg]					
látkové množství trypsinu obsaženého v 1 ml reakční směsi [nmol]					
aktivita trypsinu v 1 ml reakční směsi [nkat]					
molekulární aktivita trypsinu [s ⁻¹]					

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:

ÚLOHA 9A

doba reakce t [min]	0	5	10	15	20	25	30
spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]							

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 9B

pipetovaný objem enzymového preparátu [ml]	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
pipetovaný objem vody [ml]	2,0	1,5	1,0	0,5	0,0
spotřeba 0,02 mol.l ⁻¹ NaOH [ml]					

Podpis vedoucího cvičení: