# NÁVODY NA LABORATORNÍ CVIČENÍ: BIOCHEMIE I

Jméno:

_____

## OBSAH


ÚVOD DO SPEKTROFOTOMETRIE ..... 2

1. Určení schopnosti vzorků absorbovat UV/viditelné světlo ..... 2

2. Změření a porovnání hodnot absorbancí v absorpčním spektru dvou odlišně koncentrovaných vzorků Evansova roztoku ..... 3

3. Kazuistiky ..... 4

OPTICKÉ METODY – SPEKTROFOTOMETRIE ..... 5

1. Ověření platnost Lambertova-Beerova zákona v zadaném rozsahu koncentrací kalibrační řady roztoků $Fe^{2+}$ ..... 5

2. Určení koncentrace $Fe^{2+}$ v neznámém vzorku výpočtem z kalibrační křivky ..... 6

3. Porovnejte přístupy vhodné pro určení koncentrace $Fe^{2+}$ ..... 7

ELEKTROCHEMICKÉ METODY - POTENCIOMETRIE ..... 8

1. Kalibrace pH metru ..... 8

2. Stanovení koncentrace kyseliny octové v octu potenciometrickou titrací ..... 8

VLASTNOSTI PUFRŮ ..... 11

1. Příprava acetátového pufru o různých hodnotách pH ..... 11

2. Ověření tlumivých účinků acetátového pufru ..... 12

OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKŮ LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ ..... 14

1. Test vlastní preciznosti pipetování při přípravě roztoků ředěním ..... 14

2. Zhodnocení preciznosti (precision) a pravdivosti (trueness) vaší práce ..... 15

KINETIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ ..... 17

1. Měření a vyhodnocení kinetických parametrů reakce katalyzované laktátdehydrogenázou ..... 17

2. Určení hodnoty maximální rychlosti ($V_{max}$) a Michaelisovy konstanty ($K_m$) ..... 19

3. Výpočet katalytické koncentrace LD ze změny absorbance (pomocí kalibrátoru) ..... 20

SPECIFIČNOST ENZYMOVÉ ÚČINNOSTI A VLIV PROSTŘEDÍ ..... 21

1. Stanovení optimálního pH pro β-fruktofuranozidázu ..... 21

2. Vliv teploty ..... 22

3. Vliv koncentrace enzymu ..... 23

4. Určení enzymové specifičnosti ..... 23

# ÚVOD DO SPEKTROFOTOMETRIE

Datum:

**ÚKOLY**

1. Určete, zda předložené vzorky látek absorbují UV / viditelné světlo
2. Změřte a porovnejte hodnoty absorbancí v absorpčním spektru dvou odlišně koncentrovaných vzorků Evansova roztoku
3. Vyřešte kasuistiky

## 1. Určení schopnosti vzorků absorbovat UV/viditelné světlo

U předložených vzorků zapište, zda jsou barevné, pokud ano, odhadněte přibližně jejich absorpční maximum a porovnejte s výsledky měření spektra pomocí spektrofotometru.

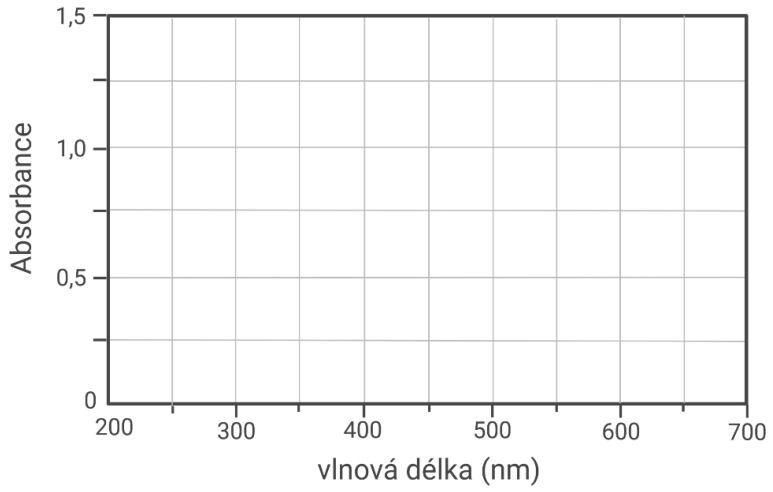
**Provedení:**

- Zapněte spektrofotometr. Na displeji spektrofotometru vyberte z nabízených možností variantu „**Scan**“. Poté stiskněte úlohu s názvem „**praktikum 1/1**“.
- Připravte si 3 kyvety-nedržíme je za hladké stěny! Do první kyvety napipetujte **2 ml destilované vody**. Buničinovým čtverečkem očistěte průhledné strany kyvety a vložte ji do spektrofotometru. Stiskněte **„Blank**“, kterým přístroj vynulujete.
- Do druhé kyvety napipetujte **2 ml roztoku albuminu** a stiskněte **„Measure“** proměřte absorpční spektrum. Opět vložte kyvetu s destilovanou vodou a přístroj vynulujte.
- Pokračujte s měřením **roztoku glukózy a Evansova roztoku**, použijte vždy suchou kyvetu. Mezi měřeními vynulujte přístroj (**„Blank**“) na destilovanou vodu.
- Do tabulky zaznamenejte absorpční maximum pro každou látku.

| **Látka** | **Barva roztoku** | **Oblast absorpce UV/VIS/NENÍ *** | | **Absorpční max (nm)** |
|---|---|---|---|---|
| | - | Odhad | Měření | |
| **Albumin** | | | | |
| **Glukóza** | | | | |
| **Evansův roztok** | | | | |

***** *Vyberte jednu z nabízených možností*

Vyfoťte si křivky absorpčních maxim a obrázek vložte nebo je načrtněte do připraveného rastru. Porovnejte odhadnuté a naměřené hodnoty.



## 2. Změření a porovnání hodnot absorbancí v absorpčním spektru dvou odlišně koncentrovaných vzorků Evansova roztoku

**Provedení:**

- Budete porovnávat absorbanci dvou vzorků. Neředěný vzorek č.1 (zásobní Evansův roztok) máte připravený již z prvního úkolu v kyvetě.
- Naředťe si zásobní Evansův roztok 5x vodou, tak abyste získali celkem 2ml zředěného roztoku (vzorek č. 2). Použijte pipetu a vzorky poté promíchejte.
- Na displeji spektrofotometru vyberte z nabízených možností variantu **Scan**. Poté stiskněte předem uloženou úlohu s názvem „**praktikum 1/2**".
- Vynulujte přístroj na slepý vzorek – kyvetu s destilovanou vodou. Stiskněte „**Blank**".
- Proměřte absorpční spektrum **roztoku č. 1**. Poté jej vylijte a propláchněte malým množstvím ředěného vzorku a osušte na buničině.
- Proměřte absorpční spektrum **roztoku č. 2.**

| | **Evansův roztok zásobní (ml)** | **Voda (ml)** | **Celkový objem (ml)** | **Absorpční maximum (nm)** | **Absorbance ve vlnové délce maxima** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Vzorek č. 1** | 2 ml | - | 2 ml | | |
| **Vzorek č. 2 Evansův roztok ředěný vodou 1:4** | | | 2 ml | | |

Porovnejte absorpční spektra, absorpční maxima a absorbance v absorpčním maximu ředěného a neředěného roztoku a hodnoty vepište do tabulky.

## Závěr:

Shrňte výsledky vašeho měření, ke zhodnocení vám mohou pomoci následující otázky:

**Vyhodnocení a interpretace výsledků úkolu č. 1:**

*Odhadli jste před měřením, zda látky absorbují světlo?*
*Jak souvisí barva Evansova roztoku s jeho absorpčním spektrem?*
*Uveďte příklady dalších organických látek v těle, které absorbují a neabsorbují viditelné světlo.*

**Vyhodnocení a interpretace výsledků úkolu č. 2**

*Jak se změnila absorbance a absorpční maximum při zředění Evansova roztoku?*

## 3. Kazuistiky

Od asistenta obdržíte kartičku s kazuistikou.

1. Na základě vašich znalostí a informací uvedených v kazuistice stručně vysvětlete princip ochrany opalovacích krémů. Odpovězte na otázky uvedené na kartičce s kazuistikou.

2. Na základě znalostí o absorpčních spektrech molekul vysvětlete změny barvy hematomu.

# OPTICKÉ METODY – SPEKTROFOTOMETRIE

Datum:

**ÚKOLY**

1. Ověřte platnost Lambertova-Beerova zákona pomocí kalibrační řady roztoků $Fe^{2+}$
2. Stanovte koncentraci $Fe^{2+}$ iontů v neznámém vzorku pomocí kalibrační křivky
3. Porovnejte dva přístupy pro určení koncentrace $Fe^{2+}$

## 1. Ověření platnost Lambertova-Beerova zákona v zadaném rozsahu koncentrací kalibrační řady roztoků $Fe^{2+}$

**Princip stanovení:** $Fe^{2+}$ jsou ve zředěných roztocích téměř bezbarvé. S 2,2'-bipyridinem (dipyridinem) reagují kvantitativně a poskytují červeně zbarvený komplex s absorpčním maximem 520 nm.

Dle následujícího postupu připravíte kalibrační řadu vzorků naředěním **zásobního roztoku $Fe^{2+}$ o koncentraci 350 µmol.l$^{-1}$.**

**Provedení:**

- Připravte si osm 50 ml odměrných baněk. Nadepište je číslem vzorku 1-8 tak jak je uvedeno v tabulce. Vzorek č. 1 slouží jako blank. Kalibrační řadu budou tvořit vzorky 2-6. Odměrné baňky označené 7 a 8 jsou určeny pro neznámé vzorky z úkolu č.2.
- Skleněnou pipetou přidejte do každé baňky s číslem vzorku 2-6 odpovídající množství zásobního roztoku $Fe^{2+}$ (viz tabulka).
- Do baněk 7 a 8 skleněnou pipetou odměřte odpovídající množství neznámého vzorku.
- Pomocí dávkovače přidejte do všech baněk dipyridin (činidlo) a následně acetátový pufr. Do každé baňky nalijte z kádinky destilovanou vodou asi centimetr pod rysku. Pomocí střičky nebo kapátka doplňte vodu přesně po rysku. Baňku uzavřete zátkou a důkladně promíchejte.
- Změřte a vepište do tabulky absorbanci vzorků při 520 nm. Při měření postupujte od vzorku s nejnižší koncentrací, na závěr pak změřte absorbance ředěného neznámého vzorku. Mezi měřeními nevyplachujte kyvetu vodou, ale malým množstvím vzorku, který budete měřit jako následující.

| **Číslo baňky** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Roztok $Fe^{2+}$ (ml)** | **-** | **2** | **5** | **10** | **15** | **20** | **-** | **-** |
| **Neznámý vzorek (ml)** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **-** | **0,5** | **5** |
| **Činidlo (ml)** | **0,5** | | | | | | | |
| **Acetátový pufr (ml)** | **5** | | | | | | | |
| **Voda (ml)** | Doplňte po rysku (50 ml) | | | | | | | |
| **Absorbance** | | | | | | | | |
| **Vypočítaná koncentrace $Fe^{2+}$ (µmol.l$^{-1}$)** | | | | | | | - | - |

**Vyhodnocení:**

- V Excelu vytvořte tabulku, která bude obsahovat vypočítané koncentrace $Fe^{2+}$ a naměřené absorbance. Sestrojte **bodový graf a hodnoty proložte přímkou**.
- Proložení bodů: klikněte pravým tlačítkem myši na libovolný bod v grafu a vyberte položku **Formát spojnice trendu.** V kartě Formát spojnice trendu vyberte **lineární**, zaškrtněte políčka **Zobrazit rovnici grafu** a **zobrazit korelační koeficient R**. Údaje zapište do protokolu.

Rovnice přímky:

Korelační koeficient:

- Zhodnoťte vaši kalibrační přímku, všímejte si její linearity, identifikujte **odlehlé body** (bod výrazně mimo přímku). Pokud je třeba odlehlé body odstraňte a důvody odstranění uveďte v závěru. Pokud jste upravili body znovu si zapište si rovnici přímky a korelační koeficient.

Rovnice přímky (upravená):

Korelační koeficient:

## 2. Určení koncentrace $Fe^{2+}$ v neznámém vzorku výpočtem z kalibrační křivky

Vzhledem k tomu, že koncentraci v neznámém vzorku jste předem neznali ani přibližně, připravili jste současně dvě ředění vzorku (100x a 10x).

Hodnoty absorbance neznámého vzorku (zkumavky 7 a 8) dosaďte do upravené (finální) rovnice kalibrační přímky a vypočtete koncentraci $Fe^{2+}$ v původním neznámém vzorku. Porovnejte obě vypočtené hodnoty. Pokud se liší, vyberte tu, kterou považujete za správnou, a volbu v závěru zdůvodněte.

Při výpočtu koncentrace nezapomeňte zohlednit ředicí faktor (pokud jste měřili absorbanci v 10× nebo 100× zředěném vzorku, přepočítejte výslednou koncentraci na koncentraci původního vzorku).

**Výpočet:**

**Koncentrace $Fe^{2+}$** ***(vzorek č. ...):*** *(nezapomeňte uvést jednotky)*

## 3. Porovnejte přístupy vhodné pro určení koncentrace $Fe^{2+}$

Jako alternativní výpočet koncentrace $Fe^{2+}$ použijte metodu standardního vzorku. Vyberte tu absorbanci standardu, která je nejblíže absorbanci neznámého vzorku a z hodnot absorbance a koncentrace standardu vypočtete koncentraci ve vzorku přímou úměrou.

**Vybraný standard:**

**Výpočet:**

**Koncentrace $Fe^{2+}$ *(vzorek č. ...):*** *(nezapomeňte uvést jednotky)*

## Závěr:

Shrňte výsledky vašeho měření, ke zhodnocení vám mohou pomoci následující otázky:

- *Byla vaše kalibrační křivka lineární v celém rozsahu? Odstranili jste nějaký odlehlý bod? Vysvětlete, proč tento bod neleží v lineární části křivky.*
- *Odvoďte z naměřených hodnot absorbance, které ze dvou použitých ředění neznámého vzorku povede pravděpodobněji ke zjištění správného výsledku. Vypočtenou koncentraci ověřte u asistenta a zhodnoťte, zda byl váš prvotní odhad správný. Jaký je rozdíl mezi oběma výsledky? Je velikost rozdílu významná?*
- *Pokud by absorbance neznámého vzorku ležela mimo lineární rozsah kalibrační přímky i po jeho naředění, jaký je správný postup?*
- *Jaké výhody či nevýhody má postup použitý v úkolu č.2 ve srovnání s postupem výpočtu v úkolu č. 3?*

# ELEKTROCHEMICKÉ METODY - POTENCIOMETRIE

Datum:

**ÚKOLY**

1. Nakalibrujte pH-metr
2. Stanovte koncentraci kyseliny octové v běžném octu pomocí potenciometrické titrace

## 1. Kalibrace pH metru

**Provedení:** Nejprve se seznámíte pod vedením asistenta s ovládáním pH metru. Potom provedete kalibraci přístroje, která musí měření pH předcházet. Ke kalibraci použijete dva standardní roztoky o známém pH v rozmezí hodnot, které u měřeného vzorku předpokládáte. V našem případě využijete pro kalibraci ftalátový pufr o pH 4,0 (červený roztok) a fosfátový pufr o pH 7 (zelený roztok). Přesný postup, jak kalibraci provést, je uveden v návodu u každého pH-metru.

## 2. Stanovení koncentrace kyseliny octové v octu potenciometrickou titrací

**Provedení:**

- Byretu naplňte po rysku roztokem NaOH (titrační činidlo).
- Do kádinky o objemu 50 ml odměřte válečkem **20 ml destilované vody**. Následně přidejte pomocí pipety **1,4 ml octa** a vložte do kádinky míchadlo. Takto jste připravili 15,3x ředěný ocet.
- Kádinku umístěte na míchačku a upravte byretu tak, aby ústí bylo nad kádinkou. Poté ponořte skleněnou elektrodu do roztoku tak, aby frita zajišťující spojení mezi vnitřní a vnější částí elektrody byla ponořená pod hladinou. Následně zapněte míchačku.
- Po ustálení odečtěte hodnotu pH a zapište do tabulky.
- Poté přidejte z byrety 1 ml titračního činidla a výsledné pH po ustálení opět zapište do tabulky. Dále přidávejte z byrety vždy po **1 ml** NaOH až do objemu 19 ml a výsledky zapisujte.
- Následně přidejte z byrety jen po **0,5 ml** NaOH až do objemu 20 ml a výsledky zapisujte.
- Od objemu 20 ml již budete dávkovat roztok NaOH **pipetou po 0,2 ml**. Výsledky a objem zapisujte. Pokračujte, dokud pH nepřekročí 9,0.
- Následně opět použijte k dávkování **byretu** a přidávejte po **0,5 ml** NaOH až do dosažení fáze plató křivky.

**Změřené pH:**

| ml NaOH | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | | | | | | | | | | | | |

| ml NaOH | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 19,5 | 20 | 20,2 | 20,4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | | | | | | | | | | | | |

| ml NaOH | 20,6 | 20,8 | 21 | 21,2 | 21,4 | 21,6 | 21,8 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | | | | | | | | | | | | |

| ml NaOH | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | | | | | | | | | | | | |

- Z naměřených hodnot sestrojte graf závislosti pH (osa-y) na množství přidaného titračního činidla NaOH (osa-x). V grafu vyznačte bod ekvivalence. Postup, jak najít bod ekvivalence najdete v teoretickém úvodu.

**Graf (foto):**

- Na základě zjištěného objemu titračního činidla, potřebného k dosažení bodu ekvivalence, vypočítejte molární koncentraci kyseliny octové. Tuto molární koncentraci následně přepočítejte na hmotnostní koncentraci (g.100 $ml^{-1}$) tak, jak bývá uvedeno na etiketě. Molární hmotnost kyseliny octové: 60,052 $g.mol^{-1}$.

**Výpočet a výsledky:**

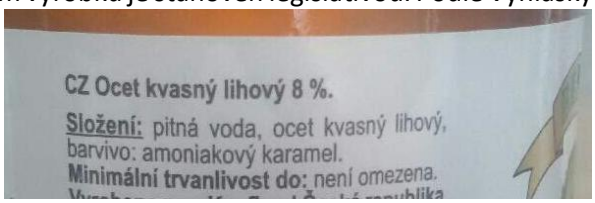
| | |
|---|---|
| **Bod ekvivalence – spotřeba NaOH (ml):** | |
| **Koncentrace kys. octové (mol. $l^{-1}$):** | |
| **Koncentrace kys. octové (g.100 $ml^{-1}$):** | |

*Pro přemýšlivé:*

*Je údaj o ředění octa před titrací při našem výpočtu důležitý, nebo jste se obešli i bez něj?*

*Dala by se vypočítat koncentrace kyseliny octové v octu přímo z naměřených hodnot pH?*

**Kvasný ocet lihový** je tradiční potravinářský výrobek, který vzniká biologickým dvoustupňovým procesem. Nejprve kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) přeměňují sacharidy na ethanol. Pro výrobu ethanolu (kvasného lihu) se v českých podmínkách tradičně používají především obilí (pšenice, žito, kukuřice) obsahující škrob, a také melasa z cukrové řepy, která obsahuje zbytky sacharózy, glukózy a fruktózy. Následně bakterie (*Acetobacter*, *Gluconobacter*) tento ethanol za přístupu kyslíku oxidují na kyselinu octovou. Výsledkem je vodný roztok kyseliny octové, který se běžně používá k ochucování a konzervaci potravin. Obsah kyseliny octové v hotovém výrobku je stanoven legislativou. Podle Vyhlášky č. 248/2018 Sb. musí být na obalu uvedena kyselost octa v procentech (% m/V) a skutečný obsah se může lišit od deklarované hodnoty směrem dolů nejvýše o 0,2 %. Nejběžněji se prodává kvasný lihový ocet označený jako 8 %.




## Závěr:

Shrňte výsledky vašeho měření do souvislého odstavce. Ke zhodnocení vám mohou pomoci následující otázky:

- *Co je vlastně pH? Na jakém principu pracuje používaný pH-metr?*
- *Jaký je vzorec kyseliny octové? Je to silná nebo slabá kyselina? Proč? Co se děje, když do ní postupně přidáváte NaOH?*
- *Splnil vzorek octa legislativní požadavky?*
- *Zhodnoťte a vysvětlete, v čem by mohla spočívat odchylka mezi Vámi stanovenou hodnotou a hodnotou uvedenou výrobcem octa na etiketě.*

*Pro přemýšlivé: Přidání prvních 2 ml NaOH vyvolá větší vzestup pH, než přidání dalších 15 ml; po počátečním strmějším vzrůstu křivka stoupá jen mírně. Proč? Co se v titrační kádince děje? Jaké tam jsou v této fázi látky?*

# VLASTNOSTI PUFRŮ

Datum:

**ÚKOLY**

1. Připravte acetátové pufry o různých hodnotách pH a porovnejte vypočtené hodnoty pH s naměřenými.
2. Odhadněte pufrační kapacitu acetátového pufru.

## 1. Příprava acetátového pufru o různých hodnotách pH

**Provedení:**

- Označte si 5 kádinek a dávkovačem do nich odměřte po **10 ml destilované vody**.
- Do první kádinky napipetujte **10 ml kyseliny octové** (c = 0,8 mol.l$^{-1}$) a důkladně promíchejte.
- Odeberte 10 ml z kádinky č.1 a přeneste je do kádinky č.2, důkladně promíchejte.
- Stejným způsobem odeberte 10 ml z kádinky č.2 a přeneste do kádinky č.3, promíchejte; pak z 3 → 4; pak z 4 → 5. Nakonec odeberte 10 ml z kádinky č.5 a vylejte (tím docílíte stejného objemu ve všech kádinkách - 10 ml). Výsledkem je geometrická řada ředění mezi kádinkami 1 až 5 (každý krok = ředění 2×).
- Do všech kádinek pak napipetujte po **10 ml octanu sodného** (c = 0,1 mol.l$^{-1}$).
- Následně změřte pH v jednotlivých kádinkách na pH metru. Nezapomeňte nejprve pH metr kalibrovat s pomocí standardních pufrů.
- Spočítejte, jaká je výsledná koncentrace kyseliny a soli v jednotlivých kádinkách. Při výpočtu nezapomeňte, že koncentrace soli a kyseliny po jejich smísení je poloviční ve srovnání s koncentracemi původními. Zkontrolujte si výsledky u asistenta nebo laborantky.
- Poté spočítejte hodnotu pH v jednotlivých kádinkách dosazením do Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice (pKa kyseliny octové = 4,76) a hodnoty doplňte do tabulky.
- Na závěr porovnejte teoretický výpočet s naměřenou hodnotou.

***!!! Pozn: pufry nevylévejte, budete s nimi dále pracovat. !!!***

**Výpočty:**

**Výsledky:**

| **Pufr č.** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
|---|---|---|---|---|---|
| **$CH_3COOH$ (mol.l$^{-1}$)** | | | | | |
| **$CH_3COONa$ (mol.l$^{-1}$)** | | | | | |
| **pH vypočtené** | | | | | |
| **pH změřené** | | | | | |

## 2. Ověření tlumivých účinků acetátového pufru

**Provedení:**

Nejprve si připravte dvě titrační baňky s roztokem **acetátového pufru č.3 z předchozího úkolu**, ve kterém jsou koncentrace obou složek, kyseliny a její konjugované zásady, stejné (viz tabulka). Kapacitu pufru budete odhadovat nejprve titrací roztokem NaOH (c = 0,05 mol.l$^{-1}$) a poté roztokem HCl (c = 0,05 mol.l$^{-1}$).

- Naplňte jednu byretu roztokem NaOH a druhou roztokem HCl po zvolenou rysku (nezapomeňte na kádinku pod byretou při plnění a na odstranění nálevky ihned po naplnění byrety).
- Připravte si první roztok: do titrační baňky napipetujte **5 ml roztoku pufru č. 3 a 5 ml destilované vody**, přidejte kapku **fenolftaleinu** a přidávejte po kapkách roztok NaOH do trvalého světle růžového zabarvení. Nezapomeňte vždy po přidání činidla roztok protřepat.
- Připravte si druhý roztok: napipetujte do titrační baňky **5 ml základního pufru č. 3 a 5 ml destilované vody,** přidejte kapku **bromfenolové modři** a přidávejte po kapkách roztok HCl do světle žlutého zabarvení. Nezapomeňte vždy po přidání činidla roztok protřepat.
- Pro třetí stanovení vyberte ten z pufrů, který má dle Vašeho uvážení **lepší schopnost udržet konstantní pH po přídavku NaOH v porovnání s pufrem č.3**. Do titrační baňky napipetujte 5 ml tohoto pufru a přidejte 5 ml destilované vody. Opět přidejte vhodný indikátor a přidávejte po kapkách roztok NaOH.
  Nezapomeňte vždy po přidání činidla roztok protřepat.
- Porovnejte spotřeby titračního činidla a vyvoďte ze svého měření závěry o tlumících schopnostech pufru.

**Výsledky:**

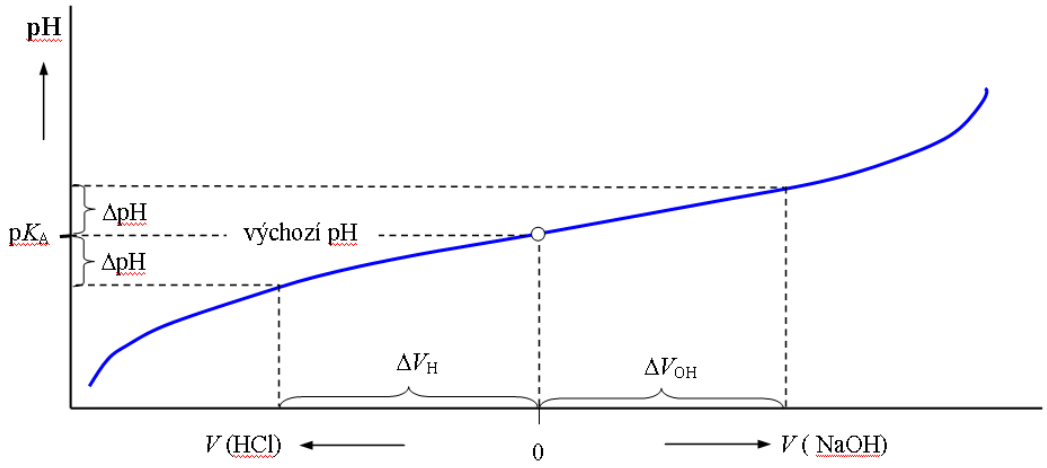
| | **Pufr č.3** | **Pufr č.3** | **…** ***Vyberte*** |
|---|---|---|---|
| **Voda (ml)** | 5 | 5 | 5 |
| **Pufr (ml)** | 5 | 5 | 5 |
| **Indikátor** | kapka | kapka | kapka |
| **Spotřeba HCl (ml)** | ----- | | ----- |
| **Spotřeba NaOH (ml)** | | ----- | |

**Závěr:**

Shrňte výsledky vašeho měření, ke zhodnocení dat vám mohou pomoci následující otázky a graf:

*Pozn.: Pro přesné určení pufrační kapacity je třeba měřit pH průběžně (kontinuálně) pH-metrem během titrace a z titrační křivky odečíst množství přidaného titrantu, které způsobí změnu pH o jednu jednotku. Toto stanovení není předmětem praktik.*

- *Popište výchozí stav před titrací (bod 0 v grafu viz níže), které složky pufru jsou přítomny v roztoku?*
- *Do grafu vepište výchozí hodnoty pH a body odpovídající ΔV HCl a ΔV NaOH.*
- *Popište, co se stane s pH, když do pufru přidáme malé množství NaOH. Napište reakci.*
- *Popište, co se stane s pH, když titrujeme pomocí HCl. Napište reakci.*
- *Jak se změní pufrovací kapacita, pokud zdvojnásobíme koncentrace kyseliny i soli v pufru.*
- *Které z vámi připravených pufrů mají nejvyšší kapacitu vůči přidávání kyseliny i zásady?*




Zdroj: https://www.wikiskripta.eu

**Kontrolní otázky:**

1. Odvoďte složení fosfátového pufru, který se vyskytuje v krvi. Disociační konstanta kyseliny fosforečné $pKa_1 = 2,16$; $pKa_2 = 7,21$; $pKa_3 = 12,67$.

2. V krvi představuje významný pufrovací systém bikarbonátový pufr. Uveďte, z jakých složek se skládá. Vypočítejte poměr těchto složek při fyziologickém pH ≈ 7,4, jestliže $pK_a(CO_2/H_2CO_3) = 6,1$. Který typ přidané látky (kyselina nebo zásada) tento systém lépe pufruje?

# OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKŮ LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ

Datum:

**ÚKOLY**

1. Otestujte experimentálně vlastní preciznost pipetování při přípravě roztoků ředěním
2. Zhodnoťte preciznost (precision) a pravdivost (trueness) vaší práce; porozumění chybám

## 1. Test vlastní preciznosti pipetování při přípravě roztoků ředěním

Připravte si mikrotitrační destičku, zásobní roztoky $KMnO_4$, R1= 0,04 mol.l$^{-1}$ a R2= 0,004 mol.l$^{-1}$, pipety a vhodné špičky (žlutá pipeta 2-20 µL, žlutá pipeta 20-200 µL, modrá pipeta 200-1000 µL).

Každý student v podskupině napipetuje roztoky dle tabulky do dvou sloupců – modrého a žlutého (sloupce 1 a 2 *nebo* 3 a 4 *nebo* 5 a 6), pipetování do sloupců zelených (9-12) provede **jeden** ze studentů v podskupině.

a) Preciznost pipetování malých objemů (modré sloupce)

Do prvního sloupce v destičce (jamky A-H) napipetujte **158 µL destilované vody** a přidejte **2,0 µL R1** (0,04 mol.l$^{-1}$ $KMnO_4$), vzorky promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním (špičku poté vyhoďte).

b) Preciznost pipetování (žluté sloupce)

Do druhého sloupce v destičce (jamky A-H) napipetujte **140 µL destilované vody** a přidejte **20 µL R2** (0,004 mol.l$^{-1}$ $KMnO_4$), vzorky promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním (špičku poté vyhoďte).

c) Preciznost sériového ředění (zelené sloupce)

- Do sloupců 9 -12 (jamky A-H) napipetujte **80 µL destilované vody** (špičku poté vyhoďte)
- Do sloupce 9 (jamky A-H) napipetujte **80 µL R2** (0,004 mol.l$^{-1}$ $KMnO_4$), vzorky promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním
- Přepipetujte **80 µL** roztoku z jamky A9 (**R9**) → do jamky A10, stejně postupujte v jamkách B9, C9 až H9, vzorky opět promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním
- Přepipetujte **80 µL** roztoku z jamky A10 (**R10**) → A11, stejně postupujte v jamkách B10, C10 až H10 vzorky opět promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním

Destilovaná voda ve sloupci č.12 bude sloužit jako blank (slepý vzorek).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Student č.1 | | Student č.2 | | Student č.3 | | | | | | | |
| A | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | | | 80µl R2 | 80µl R9 | 80µl R10 | voda |
| B | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | | | 80µl R2 | 80µl R9 | 80µl R10 | voda |
| C | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | | | 80µl R2 | 80µl R9 | 80µl R10 | voda |
| D | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | | | 80µl R2 | 80µl R9 | 80µl R10 | voda |
| E | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | | | 80µl R2 | 80µl R9 | 80µl R10 | voda |
| F | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | | | 80µl R2 | 80µl R9 | 80µl R10 | voda |
| G | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | | | 80µl R2 | 80µl R9 | 80µl R10 | voda |
| H | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | 2 µl R1 | 20µl R2 | | | 80µl R2 | 80µl R9 | 80µl R10 | voda |

- Změřte absorbanci všech vzorků v destičce při vlnové délce 520 nm. Do tabulky vepište hodnoty absorbance u metody a), b) a pro metodu c) opište hodnoty ze sloupce 11.

## 2. Zhodnocení preciznosti (precision) a pravdivosti (trueness) vaší práce

- Ve vzorcích připravených metodou a), metodou b) a metodou c), spočítejte: průměr, směrodatnou odchylku (SD versus SEM) a variační koeficient (VC).
- Vypočítejte teoretickou koncentraci $KMnO_4$ v měřených vzorcích ($c_{teor}$).
- Pomocí přiložené kalibrační křivky stanovte experimentálně zjištěnou koncentraci (c) $KMnO_4$. Do rovnice přímky kalibrace dosaďte průměrnou absorbanci a vypočtěte koncentraci.
- Vypočtěte relativní chybu (bias) vůči teoretické hodnotě:

$$\text{bias}\ (\%) = \frac{\bar{c} - c_{\text{teor}}}{c_{\text{teor}}} \times 100$$

## Výsledky a výpočty:

| | Absorbance | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Metoda a) | | | Metoda b) | | | Metoda c) (pouze sloupec 11) |
| | Student č. 1 | Student č. 2 | Student č. 3 | Student č. 1 | Student č. 2 | Student č. 3 | |
| A | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| C | | | | | | | |
| D | | | | | | | |
| E | | | | | | | |
| F | | | | | | | |
| G | | | | | | | |
| H | | | | | | | |
| Průměr | | | | | | | |
| SEM | | | | | | | |
| SD | | | | | | | |
| VC | | | | | | | |
| c $KMnO_4$ (změřená) | | | | | | | |
| c $KMnO_4$ (teoretická) | | | | | | | |
| Bias | | | | | | | |

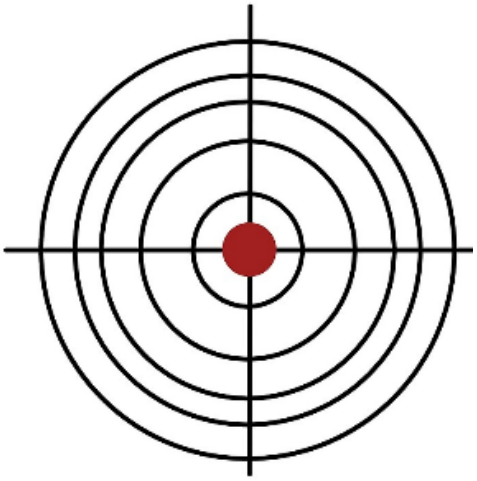
## Závěr:

Pro účely tohoto cvičení je za hlavní potenciální zdroj variability výsledků považována nepřesnost pipetování. Použitá spektrofotometrická metoda byla validována a vykazuje vyhovující pravdivost, preciznost a robustnost; ostatní zdroje analytické variability jsou proto v rámci tohoto hodnocení považovány za zanedbatelné.

Shrňte výsledky vašeho měření, ke zhodnocení dat vám mohou pomoci následující otázky.

- *Popište rozdíly mezi výsledky jednotlivých studentů. Diskutujte možné zdroje chyb, které jste zaznamenali a navrhněte opatření, jak se jim vyvarovat.*
- *Jaký typ chyb se odráží ve VC? Jaký typ chyb se odráží v hodnotě bias? Jak se liší směrodatná odchylka (SD) a bias?*
- *Na základě bias a VC rozhodněte, která z metod přípravy roztoku je ve vašich rukou nejpreciznější a která nejpravdivější.*
- *Pro každou metodu stanovení koncentrace $KMnO_4$ uveďte, jakou chybou může být zatížená, jak ji odhalíte a navrhněte, jak chybu odstranit.*

Jak byste zhodnotili svoji práci? Umístěte výsledky vašeho měření metod a) b) a c) do terče 😊. Zakreslete průměr a SD.



# KINETIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ

Datum:

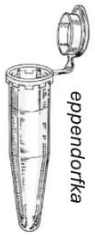
**ÚKOLY**

1. Změřte a vyhodnoťte kinetické parametry reakce katalyzované laktátdehydrogenázou.
2. Z naměřených dat určete hodnoty maximální rychlosti ($V_{max}$) a Michaelisovy konstanty ($K_m$).
3. Z naměřených dat určete aktivitu laktátdehydrogenázy ve vzorku séra

## 1. Měření a vyhodnocení kinetických parametrů reakce katalyzované laktátdehydrogenázou

**Provedení:**

- Zapněte spektrofotometr a nastavte ho dle přiloženého návodu. Zkontrolujte vlnovou délku (340 nm).Vložte kyvetu s destilovanou vodou jako slepým vzorkem a přístroj vynulujte (BLANK), pak kyvetu z přístroje vyndejte.
- Připravte si 5 eppendorfek a označte je V1 – V5.
- Do eppendorfky V1 napipetujte pufr obsahující pyruvát o koncentraci C1 (přesné koncentrace vám sdělí asistent) a napipetujte sérum (objemy jsou uvedeny v tabulce). **POZOR**! Při pipetování malých objemů (~20 µl) obzvláštně dbejte na přesnost: zajistěte, aby kapka nezůstala na stěně, a po přidání směs vždy promíchejte.




- Zkumavku promíchejte a inkubujte při 37 °C v termobloku či v vodní lázni po dobu 5 minut.
- Zkumavku vyjměte z lázně, protřepejte a přidejte startér (NADH). V okamžiku, kdy do zkumavky přidáte startér, zmáčkněte stopky.
- Směs protřepte, vzorek přelejte do kyvety, vložte do spektrofotometru.
- Přesně za 60 sekund po přidání startéru odečtěte absorbanci, další hodnoty odečtěte za 120, 180, 240 a 300 sekund po nastartování reakce. Získané výsledky zapište do tabulky na následující stránce.
- Stejným způsobem proveďte postupně měření se vzorky V2, V3, V4 a V5 (které budou obsahovat pyruvát v koncentraci C2, C3, C4 a C5).

| | **$V_1$** | **$V_2$** | **$V_3$** | **$V_4$** | **$V_5$** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Pufr + pyruvát ($C_1$) (ml)** | 0,8 ml | - | - | - | - |
| **Pufr + pyruvát ($C_2$) (ml)** | - | 0,8 ml | - | - | - |
| **Pufr + pyruvát ($C_3$) (ml)** | - | - | 0,8 ml | - | - |
| **Pufr + pyruvát ($C_4$) (ml)** | - | - | - | 0,8 ml | - |
| **Pufr + pyruvát ($C_5$) (ml)** | - | - | - | - | 0,8 ml |
| **sérum (µl)** | 20 µl | 20 µl | 20 µl | 20 µl | 20 µl |
| **Promíchejte a inkubujte při 37 °C v termobloku či v vodní lázni 5 min** | | | | | |
| **startér NADH (µl)** | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl | 200 µl |

**Výsledky**:

| | $V_1$ | | $V_2$ | | $V_3$ | | $V_4$ | | $V_5$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| konc. pyruvátu v pufru (mmol. $l^{-1}$) | C1= | | C2= | | C3= | | C4= | | C5= | |
| konc. pyruvátu ve zkumavce (V=1020 µl) | | | | | | | | | | |
| čas (s) | A | Δ A | A | Δ A | A | Δ A | A | Δ A | A | Δ A |
| 60 | | | | | | | | | | |
| | | Δ A1= | | Δ A1= | | Δ A1= | | Δ A1= | | Δ A1= |
| 120 | | | | | | | | | | |
| | | Δ A2= | | Δ A2= | | Δ A2= | | Δ A2= | | Δ A2= |
| 180 | | | | | | | | | | |
| | | Δ A3= | | Δ A3= | | Δ A3= | | Δ A3= | | Δ A3= |
| 240 | | | | | | | | | | |
| | | Δ A4= | | Δ A4= | | Δ A4= | | Δ A4= | | Δ A4= |
| 300 | | | | | | | | | | |

- Spočítejte koncentrace substrátu (pyruvátu) v inkubační směsi tvořené pipetovaným substrátem, sérem a startérem v čase nula.
- Spočítejte změny absorbance za minutu $\Delta A_1$ až $\Delta A_4$ ($\Delta A_1 = A_{120} - A_{60,}$, $\Delta A_2 = A_{180} - A_{120,}$ atd).

**Pozorování a interpretace:**

Doplňte rovnici reakce katalyzované laktátdehydrogenázou.

*Pyruvát +* *+ enzym →* *+*

Která z látek přítomných v reakční směsi absorbuje světlo o vlnové délce 340 nm?

Z hodnot **absorbance** (osa y) a **času** (osa x) vytvořte bodový graf, a to pro všech pět sledovaných koncentrací substrátu. Body proložte přímkou (vložte spojnici trendu: lineární), zobrazte rovnici přímky.

- *Klesá nebo roste absorbance v čase? Proč?*

- *Porovnejte křivky vzorků V1 – V5 mezi sebou, zaměřte se na sklon (slope). Lze sklon číselně vyjádřit? Rozdíly mezi křivkami a jejich sklonem vysvětlete.*

- *Jak byste definovali rychlost reakce? Která z vámi naměřených nebo vypočítaných hodnot vyjadřuje rychlost reakce?*

- *Závisí ve vašem pokusu rychlost reakce na koncentraci substrátu?*

Vytvořte bodový graf v Excelu, znázorňující závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci pyruvátu: na osu x vyneste koncentraci pyruvátu **[S]** (V1 – V5), na osu y rychlost reakce **v** (zvolte $\Delta A_2$, tedy změnu absorbance mezi druhou a třetí minutou; nebo průměr $\Delta A_1, \Delta A_2, \Delta A_3, \Delta A_4$). Vložte si graf do protokolu (foto stačí).

- *Popište slovně závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Roste rychlost přímo úměrně s koncentrací substrátu? Může růst donekonečna nebo existuje strop – tzv. maximální rychlost $V_{max}$? Proč? Vyznačte do grafu, kde byste hledali hodnotu $V_{max}$ (možná použijete termín z matematiky - limita).*

Pokud jste odpověděli na předchozí otázky a nepřekročili svoje matematické a chemické limity pokračujeme dál 😊 tentokrát všichni společně s asistentem. Od asistenta dostanete úkol s grafem závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Budete společně diskutovat její průběh.

## 2. Určení hodnoty maximální rychlosti ($V_{max}$) a Michaelisovy konstanty ($K_m$)

Do vašeho grafu závislosti v na [S] načrtněte $V_{max}$ a $K_m$. Odhadnuté hodnoty si zapište.

Odhad Vmax:…… Odhad Km: ……..

Napište rovnici Michaelise-Mentenové. Vysvětlete, co popisuje.

V Excelu vytvořte tabulku, která bude obsahovat reciproké (převrácené) hodnoty koncentrace substrátu – pyruvátu (1/[S]) v inkubační směsi a reciproké (převrácené) hodnoty rychlosti reakce reprezentované $\Delta A_2$ nebo průměrem $\Delta A_1, \Delta A_2, \Delta A_3, \Delta A_4$. Vytvořte bodový graf, hodnoty proložte lineární spojnicí trendu (přímkou). Zobrazte si rovnici přímky a zapište si ji.

Rovnice naší přímky ……

Porovnejte vaši rovnici přímky s převrácenou rovnici Michaelise-Mentenové (viz níže). Směrnicí přímky (m) je poměr Michaelisovy konstanty ($K_m$) a maximální rychlosti ($V_{max}$). Úsek na ose y (b) je $1/V_{max}$. Dosazením koeficientů rovnice přímky vypočítejte $V_{max}$ a $K_m$, nezapomeňte na jednotky.

Vmax = _____

Km = _____

$$y = mx + b$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

## 3. Výpočet katalytické koncentrace LD ze změny absorbance (pomocí kalibrátoru)

Aktivita enzymu vyjadřuje, kolik molů substrátu enzym přemění za jednotku času.

$$1 \text{ katal (kat)} = 1 \text{ mol.s}^{-1}$$

Katalytická koncentrace je **aktivita vztažená na objem**, v klinické biochemii se většinou vyjadřuje v mikrokatalech na litr (µkat/l).

- Pro výpočet použijeme poměrnou metodu, kdy máme kalibrátor (standardní vzorek) s naměřenou ΔA a známou katalytickou koncentrací. Od asistenta obdržíte hodnoty pro kalibrátor: ΔA a katalytickou koncentraci LD, zapište si je:

- Nejprve spočítejte průměr $\Delta A_2$ a $\Delta A_3$ vzorku V5.
- Následně vypočtěte katalytickou koncentraci LD ve vašem vzorku séra V5 pomocí přímé úměry:

Katalytické koncentrace LD ve vzorku:

Vysvětlete, proč jste pro výpočet použili ΔA vzorku 5.

# SPECIFIČNOST ENZYMOVÉ ÚČINNOSTI A VLIV PROSTŘEDÍ

Datum:

ÚKOLY

1. Stanovte pH optimum pro β-fruktofuranozidázu
2. Posuďte vliv teploty na katalytickou aktivitu β-fruktofuranozidázy
3. Posuďte vliv koncentrace β-fruktofuranozidázy na její katalytickou aktivitu
4. Určete specifičnost β-fruktofuranozidázy

**Princip:**

*Vašim úkolem bude pozorovat a ovlivňovat enzymově katalyzovanou chemickou reakci, kde sacharáza štěpí sacharózu. Substrátem je tedy disacharid sacharóza (c = 0,029 mol.l$^{-1}$). Enzymem je β-fruktofuranozidáza (invertáza, sacharáza); byla získána z kvasnic (enzymový preparát byl připraven rozmělněním 0,5 g kvasnic ve 200 ml destilované vody). Je-li enzym aktivní, rozštěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Po přidání Fehlingova činidla a povaření glukóza redukuje modrou komplexní měďnatou sloučeninu $CuSO_4$ na cihlově červený $Cu_2O$.*

*Droždí (pekařská a pivovarská kvasinka) obsahuje Saccharomyces cerevisiae. S. cerevisiae se běžně vyskytuje v potravinách; může být občas i součástí lidské. Je široce využívaná jako modelový organismus v molekulární biologii. S. cerevisiae podmíněný patogen: může způsobovat infekce imunokompromitovaných jedinců.*

## 1. Stanovení optimálního pH pro β-fruktofuranozidázu

**Provedení:**

- Do tří označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou pufry, sacharózu a enzymový preparát. Enzymový preparát je nutné před každým použitím důkladně protřepat.
- Zkumavky protřepejte a umístěte do vodní lázně (37 °C) v přední části laboratoře 
- Mezitím si v kádince připravte zásobní roztok Fehlingova činidla. Pro všechny úkoly budete potřebovat přibližně 30 ml Fehlingova činidla, které připravíte smícháním roztoků Fehling I a Fehling II. Roztoky Fehling I a Fehling II smísíte v poměru 1:1 (15 ml + 15 ml). Použijte váleček.
- Zapalte kahan a připravte si vroucí vodní lázeň.
- Po skončené inkubaci přidejte válečkem Fehlingovo činidlo a povařte ve vroucí vodní lázni.
- Do tabulky zaznamenejte zabarvení roztoků a určete, které pH je pro β-fruktofuranozidázu optimální.

| | **1.** | **2.** | **3.** |
|---|---|---|---|
| **citrát-fosfátový pufr pH** | 1 ml pH 4.0 | 1 ml pH 7.0 | 1 ml pH 8.0 |
| **sacharóza** | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| **enzymový preparát** | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Promíchejte a inkubujte při 37 °C ve vodní lázni 15 min.  | | | |
| **Fehlingovo činidlo** | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Promíchejte a povařte ve vroucí vodní lázni (kahan). | | | |
| **zabarvení** | | | |

**Pozorování**: *Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu. Na základě vašich výsledků vysvětlete vliv pH na enzymově katalyzovanou reakci.*

*Při měření pH optim byste zjistili, že při extrémně kyselém pH (pH=1) není enzym aktivní — jak ověříte, zda je enzym denaturován nebo jen dočasně inaktivován?*

## 2. Vliv teploty

**Provedení:**

- Do čtyř označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou pufr s optimálním pH a sacharózu.
- Zkumavky protřepejte a necháte inkubovat po dobu 5 minut při uvedených teplotách (ledová lázeň, stojánek při laboratorní teplotě, vodní lázeň temperovaná na 37 °C). Obsah poslední zkumavky povaříte ve vroucí vodní lázni.
- Potom do všech zkumavek přidáte dávkovací pipetou po 1 ml enzymového preparátu, protřepejte a umístíte opět při uvedených teplotách.
- Po skončené inkubaci přidáte válečkem Fehlingovo činidlo a povaříte ve vodní lázni.
- Do tabulky zaznamenejte zabarvení roztoků a popište účinnost enzymu při testovaných teplotách.

| | **1.** | **2.** | **3.** | **4.** |
|---|---|---|---|---|
| **citrát-fosfátový pufr** | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| **sacharóza** | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 |
| **teplota** | ledová lázeň | teplota laboratoře | 37 °C | vroucí vodní lázeň |
| Promíchejte a inkubujte při odpovídající teplotě/podmínkách výše 5 min. | | | | |
| **enzymový preparát** | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Promíchejte a inkubujte při odpovídající teplotě 15 min. | | | | |
| **Fehlingovo činidlo** | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Promíchejte a povařte ve vroucí vodní lázni (kahan). | | | | |
| **zabarvení** | | | | |

**Pozorování:** *Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu. Která z teplot způsobí nevratné změny ve struktuře enzymu?*

## 3. Vliv koncentrace enzymu

**Provedení:**

- Do čtyř označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou pufr, sacharózu, enzymový preparát a destilovanou vodu, protřepejte a umístíte do vodní lázně.
- Po skončené inkubaci přidáte válečkem Fehlingovo činidlo a povaříte ve vodní lázni.
- Do tabulky zaznamenejte zabarvení roztoků a popište, jak se projevila změna koncentrace enzymu na jeho aktivitě.

| | **1.** | **2.** | **3.** | **4.** |
|---|---|---|---|---|
| **citrát-fosfátový pufr** | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| **sacharóza** | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| **enzymový preparát** | 1 ml | 0,5 ml | 0,1 ml | - |
| **destilovaná voda** | - | 0,5 ml | 0,9 ml | 1 ml |
| Promíchejte a inkubujte při 37 °C ve vodní lázni 15 min. | | | | |
| **Fehlingovo činidlo** | 2 ml | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Promíchejte a povařte ve vroucí vodní lázni (kahan). | | | | |
| **zabarvení** | | | | |

**Pozorování:** *Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu***.**

## 4. Určení enzymové specifičnosti

**Provedení:**

- Do tří označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou citrát-fosfátový pufr s optimálním pH
    - napipetujete substráty (sacharóza, škrob, nebo želatina)
    - přidáte enzymový preparát, protřepete a umístíte do vodní lázně s teplotou 37 °C.
- Po skončené inkubaci přidáte kapátkem Fehlingovo činidlo a povaříte ve vroucí vodní lázni.
- Do tabulky zaznamenejte zabarvení roztoků a určete specifický/é substrát/y.

| | **1.** | **2.** | **3.** |
|---|---|---|---|
| **citrát-fosfátový pufr** | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| **sacharóza** | 2 ml | - | - |
| **škrob** | - | 2 ml | - |
| **želatina** | - | - | 2 ml |
| **enzymový preparát** | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Promíchejte a inkubujte při 37 °C ve vodní lázni 15 min.  | | | |
| **Fehlingovo činidlo** | 2 ml | 2 ml | 2 ml |
| Promíchejte a povařte ve vroucí vodní lázni (kahan). | | | |
| **zabarvení** | | | |

**Pozorování**: *Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu. Co je substrátová specificita enzymu (jak a proč enzym váže jen určité molekuly). Jaký je chemický rozdíl mezi sacharózou a škrobem? Proč sacharáza rozštěpí sacharózu, ale ne škrob?*

**Závěr**: **Znázorněte strukturu substrátu a produktů enzymové reakce a vysvětlete princip jejich detekce.** Nejprve si dobře promyslete struktury substrátu a produktů enzymové reakce. Vzorce zakreslete. Vysvětlete princip barevné změny z modré na cihlově červenou při detekci produktu rozkladu sacharózy.

*D-glukóza – lineární vzorec*

*α-D-glukopyranóza cyklický vzorec -zakroužkujte poloacetálový hydroxyl*

*β-D-fruktofuranóza – cyklický vzorec zakroužkujte poloacetálový hydroxyl*

*D-fruktóza – lineární vzorec*

*sacharóza*

**Co jste se dozvěděli z pokusů o enzymu – sacharáze** *S. cerevisiae***?**

*Při kterém pH pracuje nejlépe? Při jaké teplotě pracuje nejlépe? S jakým substrátem?*

**Problémy k řešení:**

1) Jak je to se sacharázou u lidí?

*V lidském organismu se oligosacharidy štěpí v tenkém střevě, konkrétně v duodenu a jejunu. Štěpení probíhá na membráně enterocytů, kde je lokalizovaný komplex sacharáza-isomaltáza. Sacharáza katalyzuje hydrolýzu sacharózy na glukózu + fruktózu. Isomaltázová složka komplexu štěpí převážně α-1,6 vazby (větvené části škrobu — amylopektinu).*

- *Porovnejte pH optimum lidské a mikrobiální sacharázy. Porovnejte pH s hodnotami pH v žaludku, duodenu, tenkém střevě, tlustém střevě).*

2) Jak udržíme při životě buňky v buněčné laboratoři?

*Při in-vitro kultivaci buněk používáme médium s upraveným pH přizpůsobeným typu buněk. Pro běžné savčí buňky se médium upravuje na pH ≈ 7,2–7,4*

- *Co musí médium pro kultivaci obsahovat, aby se tlumily výkyvy pH?*
- *Porovnejte pH v extracelulárním a intracelulárním prostoru a v lysozomech.*

3) Jakto, že funguje PCR?

*Při PCR (polymerázová řetězová reakce) se používá enzym, který staví z nukleotidů nové vlákno DNA. PCR probíhá jako opakovaný cyklus tří hlavních kroků:*

- *Denaturace — dvojvláknová DNA se zahřeje (obvykle ~95 °C), čímž se přeruší vodíkové vazby mezi bázemi a dvojitá šroubovice se rozvine na jednovláknovou DNA.*
- *Annealing (připojení primerů) — teplota se sníží (typicky 50–65 °C), což umožní komplementárním oligonukleotidovým primerům připojit se (hybridizovat) k cílovým sekvencím na jednovláknové DNA.*
- *Elongace (prodloužení) — při optimální teplotě (elongace při PCR probíhá obvykle při 72 °C), enzym rozpozná 3' konec primeru a katalyzuje začleňování dNTP (nukleotidů), čímž syntetizuje nové komplementární vlákno.*

- *Identifikujte enzym používaný v PCR. Jaké vlastnosti musí mít, aby v podmínkách PCR zůstal funkční? Jaký konkrétní enzym se proto v PCR používá? Vysvětlete také pojmy „termolabilita", „termostabilita" a „denaturace" a uveďte, proč jsou tyto vlastnosti klíčové pro úspěch PCR. Dala by se metoda provést i za použití běžné eukaryotické (např. lidské) polymerázy?*

*KONEC. Na shledanou v Biochemii II.*