

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 platnosti 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	10
1. Příprava acetátového pufru o různých hodnotách pH	10
2. Ověření tlumivých účinků acetátového pufru	11
Ovlivnění výsledků laboratorních vyšetření	13
1. Test vlastní přesnosti pipetování při přípravě roztoků ředěním	13
2. Zhodnocení přesnosti (precision) a správnost (trueness) vaší práce;	14
KINETIKA ENZYMOVÝCH REAKCÍ	16
1. Měření a vyhodnocení kinetických parametrů reakce katalyzované laktátdehydrogenázou	16
2. Určení hodnoty maximální rychlosti ($V_{\max}$) a Michaelisovy konstanty (K_m)	18
3. Výpočet aktivity LD ze změny absorbance (pomocí kalibrátoru)	19
SPECIFIČNOST ENZYMOVÉ ÚČINNOSTI A VLIV PROSTŘEDÍ	20
1. Stanovení optimálního pH pro β -fruktofuranozidázu	20
2. Vliv teploty	21
3. Vliv koncentrace enzymu	22
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 absorpční vlny v absorpčním spektru dvou odlišně koncentrovaných vzorků Evansova roztoku
3. Vyřešte kasuistiky

1. Určení schopnosti vzorků absorbovat UV/viditelné světlo

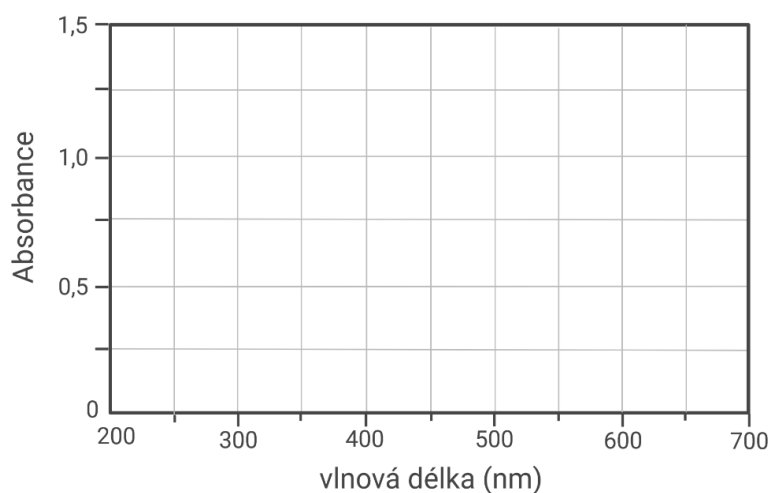
U předložených vzorků запиšte, zda jsou barevné, pokud ano, odhadněte přibližně jejich absorpční maximum a porovnejte s výsledky měření spektra pomocí spektrofotometru.

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**. Buničínovým čtverečkem očistěte průhledné strany kyvety a vložte ji do spektrofotometru. Stiskněte „**Blank**“, kterým přístroj vynulujete.
- Do druhé kyvety napipetujte **2 ml roztoku glukózy** a proměřte absorpční spektrum. Opět vložte kyvetu s destilovanou vodou a přístroj vynulujte.
- Pokračujte s měřením **albuminu a Evansova roztoku**, použijte vždy suchou kyvetu. Mezi měřeními vynulujte přístroj na destilovanou vodu.
- Do tabulky zaznamenejte absorpční maxima.

Látka	Barva ANO/NE	Oblast absorpce UV/VIS/NENÍ		Absorpční max (nm)	
		Odhad	Měření	Odhad	Měření
Glukóza					
Albumin					
Evansův roztok					

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. Naředěte si do čisté zkumavky 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 („Blank“): kyvetu s destilovanou vodou. Očistěte průhledné strany kyvety a vložte ji do spektrofotometru. Stiskněte „**Blank**“.
- Do kyvety nalijte **roztok č. 1** (neředěný) a proměřte absorpční spektrum. Poté jej vylijte a propláchněte malým množstvím ředěného vzorku a osušte na buničině.
- Teprve potom do kyvety nalijte **roztok č. 2** (ředěný) a proměřte absorpční spektrum.

	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:

Jak přesné byly vaše odhady absorpčních maxim?

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

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 $350 \mu\text{mol.l}^{-1}$** .

Provedení:

- Připravte si osm 50 ml odměrných baněk. Nadepište je číslem vzorku 1-8 tak jak je uvedeno v tabulce. Kalibrační řadu budou tvořit vzorky 1-6. 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 stříčky 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 $\text{Fe}^{2+} (\mu\text{mol.l}^{-1})$							-	-

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 запиšte do protokolu.

Rovnice přímky:

Korelační koeficient:

- Zhodnoťte vaši kalibrační přímkou, všimněte si její linearity, identifikujte **odlehle body** (bod výrazně mimo přímkou). Pokud je třeba odlehle body odstraňte a důvody odstranění uveďte v závěru. Pokud jste upravili body znovu si запиšte 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) dosadíte 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 10x nebo 100x 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 nejbližší 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? Proč?*
- *Které z vašich dvou ředění neznámého vzorku vedlo ke zjištění správného výsledku? 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?*

ÚKOLY

- ## 1. Kalibrace pH metru

2. Stanovení koncentrace kyseliny octové v octu potenciometrickou titrací

- 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 запиšte do tabulky.
- Poté přidejte z byrety 1 ml titračního činidla a výsledné pH po ustálení opět запиšte do tabulky. Dále přidávejte z byrety vždy po **1 ml** NaOH až do objemu 19 ml a výsledky zapisujte.
- Následně přidejte byretou jen po 0,5 ml NaOH až do objemu 20 ml.
- Od objemu 20 ml již budete dávkovat roztok NaOH pipetou po 0,2 mL až do objemu 22 ml.
- Od objemu 22 ml opět použijte k dávkování byretu a přidávejte po **0,5 ml** NaOH až do objemu 23 ml.
- A nakonec opět po **1 ml** NaOH až do celkového objemu 25 ml (viz tabulka).

Změřené pH:

[illegible][illegible][illegible]

- 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.
- Na základě zjištěného objemu titračního činidla, potřebného k dosažení bodu ekvivalence, dopočítejte molární koncentraci kyseliny octové (nezapomeňte zahrnout také ředění). Tuto koncentraci následně přepočítejte na hmotnostní koncentraci ($\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$) tak, jak bývá uvedeno na etiketě a následně hodnoty vypočítané a uváděné výrobcem mezi sebou porovnejte. (Molární hmotnost kys. octové: $60,052 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Výpočet a výsledky:

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

Pro přemýšlivé: Je pro nás ve výsledku údaj o ředění při výpočtech v tomto případě důležitý, nebo bychom se obešli i bez něj?

Závěr:

Shrňte výsledky vašeho měření, 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?*
- *Zhodnoťte a vysvětlete, v čem by mohla spočívat případná odchylka mezi vaší hodnotou a hodnotou uvedenou výrobcem octa na etiketě.*

VLASTNOSTI PUFRŮ

Datum:

ÚKOLY

1. Připravte acetátové pufrы o různých hodnotách pH a porovnejte vypočtené hodnoty pH s naměřenými.
2. Odhadněte pufrací 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** ($c = 0,8 \text{ mol.l}^{-1}$) 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** ($c = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$).
- 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 (pK_a kyseliny octové = 4,76) a hodnoty doplňte do tabulky.
- Na závěr porovnejte teoretický výpočet s naměřenou hodnotou.

!!! Pozn: pufrы nevylévejte, budete s nimi dále pracovat. !!!

Výpočty:

Výsledky:

Pufr č.	1	2	3	4	5
$\text{CH}_3\text{COOH} (\text{mol.l}^{-1})$					
$\text{CH}_3\text{COONa} (\text{mol.l}^{-1})$					
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 ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$) a poté roztokem HCl ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$).

- 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 přidavku NaOH**. 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:

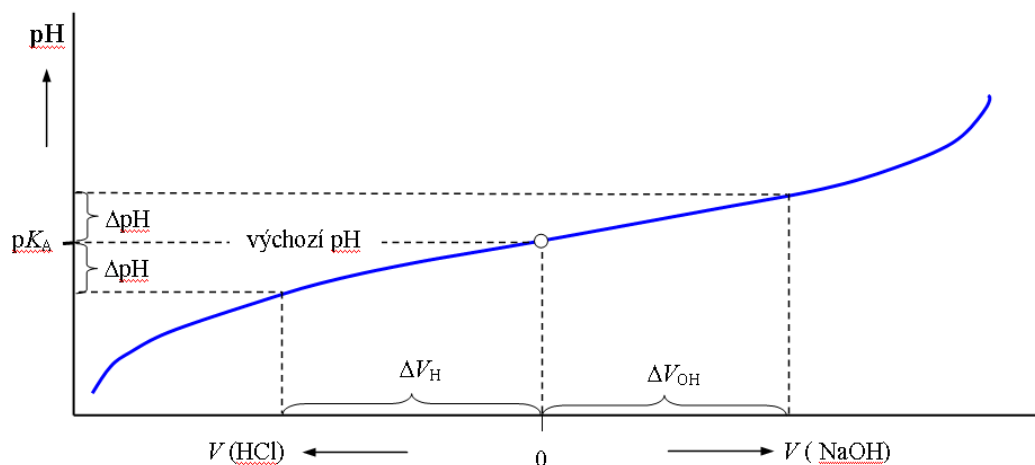
	Pufr č.3	Pufr č.3	... Vyberte
Voda (ml)	5	5	5
Pufr (ml)	5	5	5
Indikátor	kapka	kapka	kapka
Spotřeba HCl (ml)	-----		-----
Spotřeba NaOH (ml)		-----	

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 $\Delta V \text{ HCl}$ a $\Delta V \text{ NaOH}$.
- 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 $pK_{a1} = 2,16$; $pK_{a2} = 7,21$; $pK_{a3} = 12,67$.
2. V krvi představuje významný pufrovací systém bikarbonátový pufr. Uveďte, z jakých složek se skládá. Vypočítejte poměr těchto složek při fyziologickém $pH \approx 7,4$, jestliže $pK_a(\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3) = 6,1$. Který typ přidané látky (kyselina nebo zásada) tento systém lépe pufruje?

OVLIVNĚNÍ VÝSLEDKŮ LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ

Datum:

ÚKOLY

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

1. Test vlastní přesnost pipetování při přípravě roztoků ředěním

Připravte si mikrotitrační destičku, zásobní roztoky KMnO_4 , $R_1 = 0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ a $R_2 = 0,004 \text{ mol.l}^{-1}$, 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) Přesnost pipetování malých objemů (modré sloupce)

Do prvního sloupce v destičce (jamky A-H) napipetujte **158 μL destilované vody** a přidejte **2,0 μL R_1** ($0,04 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KMnO}_4$), vzorky promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním (špičku poté vyhodte).

b) Přesnost pipetování (žluté sloupce)

Do druhého sloupce v destičce (jamky A-H) napipetujte **140 μL destilované vody** a přidejte **20 μL R_2** ($0,004 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KMnO}_4$), vzorky promíchejte opakovaným nasátím do špičky a vypouštěním (špičku poté vyhodte).

c) Přesnost sériového ředění (zelené sloupce)

- Do sloupců 9 -12 (jamky A-H) napipetujte **80 μL destilované vody** (špičku poté vyhodte)
- Do sloupce 9 (jamky A-H) napipetujte **80 μL R_2** ($0,004 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KMnO}_4$), 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 R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2			80 μL R_2	80 μL R_9	80 μL R_{10}	voda
B	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2			80 μL R_2	80 μL R_9	80 μL R_{10}	voda
C	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2			80 μL R_2	80 μL R_9	80 μL R_{10}	voda
D	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2			80 μL R_2	80 μL R_9	80 μL R_{10}	voda
E	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2			80 μL R_2	80 μL R_9	80 μL R_{10}	voda
F	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2			80 μL R_2	80 μL R_9	80 μL R_{10}	voda
G	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2			80 μL R_2	80 μL R_9	80 μL R_{10}	voda
H	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2	2 μL R_1	20 μL R_2			80 μL R_2	80 μL R_9	80 μL R_{10}	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 přesnosti (precision) a správnost (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 dosadte průměrnou absorbanci a vypočtete koncentraci.
- Vypočtete relativní chybu (bias) vůči teoretické hodnotě:

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

Výsledky a výpočty:

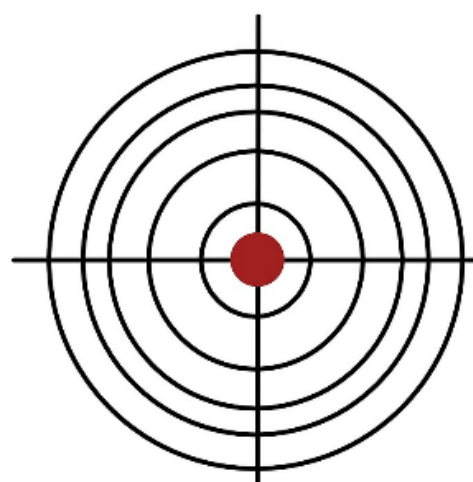
	Absorbance						
	Metoda a)			Metoda b)			Metoda c) (pouze sloupec 11)
	Student č. 1	Student č. 2	Student č. 3	Student č. 1	Student č. 2	Student č. 3	
A							
B							
C							
D							
E							
F							
G							
H							
Průměr							
SEM							
SD							
VC							
c KMnO_4 (změřená)							
c KMnO_4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

Závěr:

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 navrhňte 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 nejpřesnější a která nejspřávnější.*
- *Pro každou metodu stanovení koncentrace KMnO_4 uveďte, jakou chybou může být zatížená, jak ji odhalíte a navrhňte, 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. Nastavte vlnovou délku (340 nm) a vložte kyvetu s destilovanou vodou jako slepým vzorkem a přístroj vynulujte (BLANK), pak kyvetu z přístroje vyndejte.
- Připravte si 5 zkumavek a označte je V1 – V5.
- Do zkumavky V1 napipetujte pufr obsahující pyruvát o koncentraci C1 (přesné koncentrace vám sdělí asistent) a napipetujte sérum (objemy jsou uvedeny v tabulce).
- Zkumavku promíchejte a inkubujte při 37 °C ve vodní lázni po dobu 5 minut.
- Zkumavku vyjměte z lázně protřeptejte 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 ve vodní lázni 5 min					
startér NADH (μl) 	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl

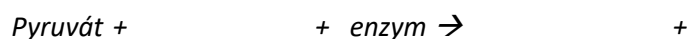
Výsledky:

	V₁		V₂		V₃		V₄		V₅	
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 ΔA_1 až ΔA_4 ($\Delta A_1 = A_{120} - A_{60}$, $\Delta A_2 = A_{180} - A_{120}$, atd).

Pozorování a interpretace:

Doplňte rovnici reakce katalyzované laktátdehydrogenázou.



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 všechny čtyři sledované koncentrace substrátu. Body proložte přímkou, 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: na osu x vynesete koncentraci pyruvátu **[S]** (V1 – V5), na osu y rychlost reakce **v** (zvolte $\Delta A_{2,}$, tedy změnu absorbance mezi druhou a třetí minutou; odpovíme si proč).

- *Popište závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Roste rychlost v přímo úměrně s [S]? 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 kartičku 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 . 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 ΔA_2 . Vytvořte bodový graf, hodnoty proložte přímkou. Zobrazte si rovnici přímky a zapište si ji.

Rovnice přímky

Porovnejte vaši rovnici přímky s převrácenou rovnicí Michaelise-Mentenové (viz níže). Směrnici přímky (k) je poměr Michaelisovy konstanty (K_m) a maximální rychlosti (V_{max}). Úsek na ose y (q) je $1/V_{max}$. Dosazením koeficientů rovnice přímky vypočítejte V_{max} a K_m .

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

V_{max}

K_m

3. Výpočet aktivity LD ze změny absorbance (pomocí kalibrátoru)

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

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

- Pro výpočet použijeme poměrnou metodu, kdy máme kalibrátor (standardní vzorek) s naměřenou ΔA a známou aktivitou. Od asistenta obdržíte hodnoty pro kalibrátor: ΔA a aktivitu LD, zapište si je:
- Nejprve spočítejte průměr ΔA_2 a ΔA_3 vzorku V5.
- Následně vypočtete aktivitu LD ve vašem vzorku séra V5 pomocí přímé úměry:

Aktivita 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:

Vaším úkolem bude pozorovat a ovlivňovat chemickou reakci, kde sacharáza štěpí sacharózu. Substrátem je tedy disacharid sacharóza ($c = 0,029 \text{ mol.l}^{-1}$). 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 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 využívána 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 pufr, sacharózu a enzymový preparát. Enzymový preparát je před každým použitím třeba protřepat.
- Zkumavky protřepete a umístíte do vodní lázně (37 °C).
- V mezidobí si připravte v kádince zásobní roztok Fehlingova činidla. Smísíte v poměru 1:1 roztoky Fehling I a Fehling II. Pro všechny úkoly budete potřebovat přibližně 30 ml činidla.
- Zapalte kahan a připravte si vodní lázeň.
- Po skončené inkubaci přidejte válečkem Fehlingovo činidlo a povařte ve 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 vodní lázni nad kahanem.			
zabarvení			

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

Při měření pH optim zjistíte, že při extrémně kyselém pH ($\text{pH}=1$) 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 protřepete a necháte inkubovat po dobu 5 minut při uvedených teplotách (ledová lázeň, stojánek při laboratorní teplotě, vodní lázeň temperovaná na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Obsah poslední zkumavky povaříte.
- Potom do všech zkumavek přidáte dávkovací pipetou po 1 ml enzymového preparátu, protřepete 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	$37\text{ }^{\circ}\text{C}$	var
Promíchejte a inkubujte při odpovídající teplotě <u>5 min.</u>				
enzymový preparát	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Promíchejte a inkubujte při odpovídající teplotě <u>15 min.</u>				
Fehlingovo činidlo	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Promíchejte a povařte ve vodní lázni.				
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, protřepete 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 <u>15 min.</u>				
Fehlingovo činidlo	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Promíchejte a povařte ve vodní lázni and kahanem.				
zabarvení				

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

4. Určení enzymové specifčnosti

Provedení:

- Do tří označených zkumavek dáte v uvedených objemech a pořadí dávkovači a dávkovací pipetou citrát-fosfátový pufr s optimálním pH
 - napipetujete substráty
 - přidáte enzymový preparát, protřepete a umístíte do vodní lázně s teplotou 37 °C.
- Po skončené inkubaci přidáte kapátkem Fehlingovo činidlo a povaříte ve 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 vodní lázni.			
zabarvení			

Pozorování: Krátce shrňte, co je výsledkem vašeho pokusu. Co je substrátová specifita 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: Nejprve si dobře promyslete struktury substrátu a produktů enzymové reakce. Vzorce zakreslete. Vysvětlíte princip barevné změny z modré na cihlově červenou při detekci produktu rozkladu sacharózy.





sacharóza

Co jste se dozvěděli z pokusů o enzymu - sacharáze?

Při kterém pH pracuje nejlépe? Kde v lidském těle by takové pH přirozeně panovalo (porovnejte pH s hodnotami pH v žaludku, duodenu, tenkém střevě, tlustém střevě)? Při jaké teplotě pracuje nejlépe? S jakým substrátem?

Problémy k řešení:

1) Jak je to se sacharázou u lidí?

V lidském organismu se sacharidy 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). Bez isomaltázové aktivity by v lumen střeva zůstaly nestrávené dextriny, které mohou být mikrobiálně fermentovány v tlustém střevě a způsobovat nadýmání a průjem.

- *Porovnejte pH optimum lidské a mikrobiální sacharázy.*

2) Jak udržíme při životě buňky v laboratoři?

Při in-vitro kultivaci buněk používáme médium s upraveným pH přizpůsobeným typu buněk. Pro běžné savčí buňky se médium upravuje na $\text{pH} \approx 7,2-7,4$

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

3) Odhalte termostabilní enzym.

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 $\sim 95^\circ\text{C}$), čímž se přeruší vodíkové vazby mezi bázemi a dvojité šroubovice se rozvine na jednovláknovou DNA.*
 - *Annealing (připojení primerů) — teplota se sníží (typicky $50-65^\circ\text{C}$), což umožní komplementárním oligonukleotidovým primerům připojit se (hybridizovat) k cílovým sekvencím na jednovláknové DNA.*
 - *Elongace (prodloužení) — při optimální teplotě (např. $\sim 72^\circ\text{C}$), enzym rozpozná 3' konec primeru a katalyzuje začleňování dNTP (nukleotidů), čímž syntetizuje nové komplementární vlákno.*
- *Identifikujte enzym používaný v PCR a vysvětlete princip reakce a pojmy „termolabilita“ a „termostabilita“, denaturace.*