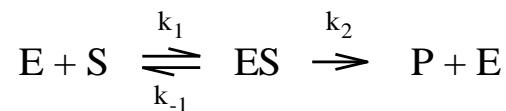


1 Teoretický úvod

1.1 Základní konstanty enzymové kinetiky

Enzymy urychlují průběh chemických reakcí v živých organismech. Snížením aktivační energie, která je nezbytná k tomu, aby reakce proběhla, urychlují dosažení rovnováhy mezi substráty a produkty, ale neovlivňují složení reakční směsi. V počátečních studiích enzymové kinetiky bylo prokázáno, že pokud je koncentrace substrátu mnohem vyšší než koncentrace enzymu, reakční rychlost se stává nezávislou na koncentraci substrátu a je tedy vzhledem k substrátu nultého řádu. Předpokládá se, že celková reakce je složena ze dvou elementárních reakcí podle následujícího modelu:



Enzym (E) tvoří se substrátem (S) komplex enzym-substrát ([ES]), který se následně rozkládá na produkty (P) a enzym se opět uvolní. Konstanta k_1 je rychlostní konstanta druhého řádu (jednotka 1/mol.s, 1/mol.min), konstanty k_{-1} a k_2 jsou rychlostní konstanty prvního řádu (jednotka 1/s, 1/min). Je-li enzym složený z několika identických podjednotek, E se vztahuje spíše k aktivním místům než k molekulám enzymu. Pokud je množství substrátu dostatečné k tomu, aby byl veškerý enzym přeměněn na formu [ES], druhý krok reakce se stane krokem určujícím rychlost reakce. Další zvyšování koncentrace substrátu nepovede ke zvýšení rychlosti enzymové reakce. Rychlost druhého kroku reakce je dána vztahem

$$v = \frac{dP}{dt} = k_2 \times [ES].$$

Celková rychlost tvorby komplexu [ES] odpovídá rozdílu mezi rychlostí jeho vzniku a rozpadu:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES].$$

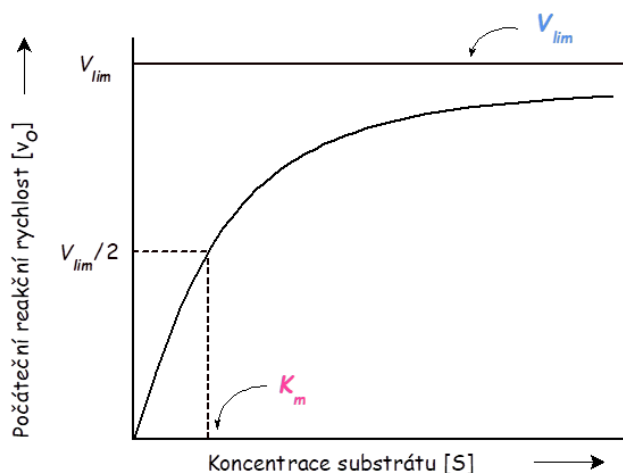
Pro řešení této rovnice jsou nezbytné zjednodušující předpoklady – předpoklad rovnováhy a předpoklad ustáleného stavu. Leonor Michaelis a Maude Mentenová předpokládali, že k_{-1} je výrazně větší než k_2 a první krok reakce tedy dosahuje rovnováhy. Disociační konstanta (K_S) pro první krok enzymové reakce je dána vztahem

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}.$$

Předpoklad ustáleného stavu vychází ze skutečnosti, že za fyziologických podmínek je běžný velký nadbytek substrátu vůči enzymu. Koncentrace komplexu [ES] zůstává v čase přibližně konstantní, dokud není substrát téměř úplně vyčerpán. Rychlost syntézy komplexu [ES] se musí rovnat rychlosti jeho rozpadu, komplex [ES] zůstává v tzv. ustáleném stavu. Výjimkou je tzv. přechodová fáze, která obvykle trvá pouze několik milisekund po smíchání enzymu a substrátu.

Z uvedených předpokladů a s ohledem na praktické použití experimentálně měřitelných hodnot byla odvozena rovnice popisující rychlost enzymové reakce, tzv. rovnice Michaelise a Mentenové, jejímž grafem je pravoúhlá hyperbola (Obr. 1):

$$v_0 = \frac{V_{lim} \times [S]}{K_M + [S]}$$



Obr. 1 Grafické vynesení rovnice Michaelise a Mentenové.

Rovnice Michaelise a Mentenové je základní rovnicí enzymové kinetiky. Počáteční rychlost v_0 je v praxi rychlost měřená dříve, než se přibližně 10 % substrátu přemění v produkt. Limitní nebo také maximální rychlost v_{lim} je rychlost, která nastává při vysokých koncentracích substrátu, kdy je enzym zcela satureován, tedy všechen ve formě komplexu [ES]. K_M je tzv. Michaelisova konstanta, konstanta poloviční saturace, je to koncentrace substrátu, při které je reakční rychlost rovna polovině maximální rychlosti. Závisí na druhu enzymu, povaze substrátu, je funkcí teploty a pH. K_M může být vyjádřena následovně:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_S + \frac{k_2}{k_1}$$

Protože K_S je disociační konstanta komplexu ES, afinita enzymu k substrátu vzrůstá s klesající K_S . Michaelisova konstanta je měřítkem afinity enzymu k jeho substrátu za předpokladu, že k_2/k_1 je malé ve srovnání s K_S , tj. že $k_2 < k_{-1}$. Druhým faktorem při posuzování vztahu enzym-substrát je limitní rychlost, tzn. rychlost přeměny substrátu. Z tohoto hlediska je nejlepším substrátem daného enzymu ten, jehož poměr V_{lim}/K_M je nejvyšší.

Měřítkem katalytické účinnosti enzymů je katalytická konstanta, která je dána vztahem

$$k_{kat} = \frac{V_{lim}}{[E]_T}$$

$[E]_T$ je celkové množství enzymu. Hodnota katalytické konstanty se označuje také jako číslo obratu nebo číslo přeměny enzymu a udává počet reakčních dějů, které každé aktivní místo katalyzuje za jednotku času.

Pro model Michaelise a Mentenové je k_{kat} rovno k_2 . Je-li $[S] \ll K_M$, tvoří se jen velmi málo komplexu [ES], díky čemuž koncentrace volného enzymu téměř odpovídá celkové

koncentraci enzymu a rovnici Michaelise a Mentenové můžeme redukovat na rychlostní rovnici druhého řádu:

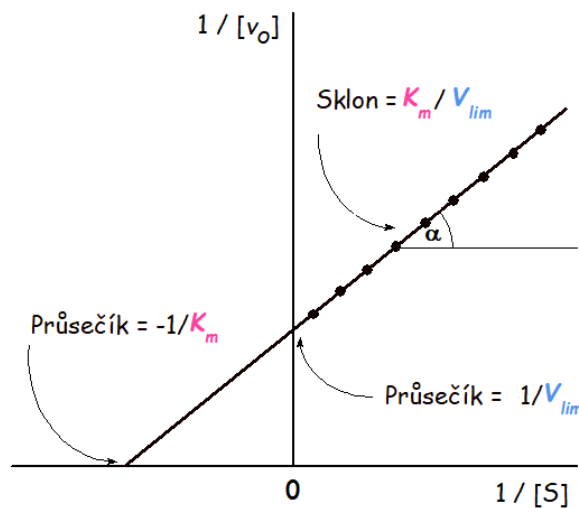
$$v_0 = \frac{k_2}{K_M} \times [E]_T \times [S] = \frac{k_{kat}}{K_M} \times [E] \times [S].$$

Hodnota k_{kat}/K_M je zdánlivá rychlostní konstanta druhého řádu enzymové reakce a je měřítkem katalytické účinnosti enzymu.

Určení kinetických konstant K_M a V_{lim} z vynesení v_0 proti $[S]$ je v praxi velmi obtížné a nepřesné. Pro určení těchto hodnot z kinetických dat bylo formulováno několik typů vynesení, z nichž každé má své výhody a nevýhody. Běžnou metodou je linearizace dle Hanse Lineweavera a Deana Burka, která hyperbolu převede na přímku, která neprochází počátkem:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{lim}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}}.$$

Do grafu (Obr. 2) se vynáší $1/v_0$ proti $1/[S]$. Přímka protíná osu $1/v_0$ v bodě $1/v_{lim}$, osu $1/[S]$ v bodě $-1/K_M$ a směrnici přímky je K_M/V_{lim} . Další lineární vynesení jsou uvedena v následující tabulce (Tab. 1).



Obr. 2 Grafické vynesení rovnice Lineweavera a Burka.

Tab 1. Lineární vynesení kinetických měření.

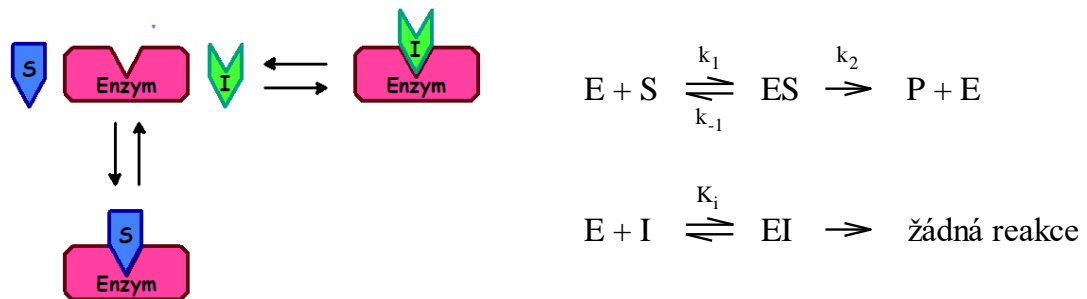
linearizace	rovnice	vynesení
dle Hanse a Woolfa	$\frac{[S]}{v_0} = \frac{1}{V_{lim}} \times [S] + \frac{K_M}{V_{lim}}$	$[S] / v_0$ proti $[S]$
dle Woolfa, Augustinssona a Hofstee	$v_0 = -K_M \times \frac{v_0}{[S]} + V_{lim}$	v_0 proti $v_0 / [S]$
dle Eadie a Scatcharda	$\frac{v_0}{[S]} = -\frac{1}{K_M} \times v_0 + \frac{V_{lim}}{K_M}$	$v_0 / [S]$ proti v_0

1.2 Inhibice a inhibitory

Mnoho látek se může na enzym navázat způsobem, který následně ovlivní vazbu substrátu nebo jeho reakční obrat, a tím změni jeho aktivitu. Látky, které aktivitu enzymu (rychlost enzymových reakcí) snižují, jsou označovány jako inhibitory. Naopak látky, které tímto způsobem aktivitu enzymu zvyšují, jsou označovány jako aktivátory. Inhibici rozlišujeme ireversibilní a reversibilní. Při ireversibilní inhibici dochází vazbou inhibitoru na enzym nebo na komplex enzym-substrát ke kovalentní modifikaci funkčních skupin enzymu. Při reversibilní inhibici je vazba inhibitoru nekovalentní a inhibitor může z komplexu enzym-inhibitor [EI] zase oddisociovat. Nejběžnějšími typy reverzibilní inhibice je inhibice kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Inhibované reakce jsou popisovány tzv. stupněm inhibice i , který je definován vztahem $i = \frac{v-v_i}{v}$, kde v je rychlost neinhibované reakce a v_i je rychlost inhibované reakce. Vztah mezi enzymem a inhibitorem charakterizuje inhibiční konstanta K_i , která odpovídá disociační konstantě komplexu enzym-inhibitor: $E + I \leftrightarrow EI$; $K_i = \frac{[E] \times [I]}{[EI]}$.

1.2.1 Kompetitivní inhibice

Kompetitivní inhibitor obvykle strukturně připomíná substrát a se substrátem soutěží o vazebné místo (Obr. 3). Váže se do aktivního místa enzymu nebo do jeho blízkosti a dochází k tvorbě komplexu [EI], který je katalyticky neúčinný. Kompetitivní inhibitor tímto způsobem snižuje koncentraci volného enzymu schopného vázat substrát.

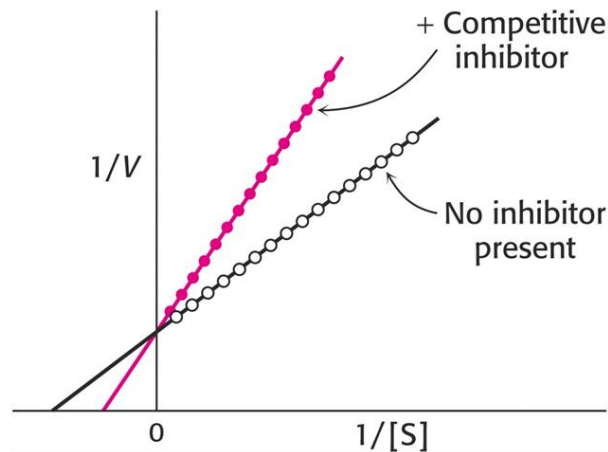


Obr. 3 Model kompetitivní inhibice.

- Inhibiční konstanta je popsána vztahem $K_i = \frac{[E] \times [I]}{[EI]}$ a udává koncentraci kompetitivního inhibitoru, při které se zdvojnásobí směrnice přímky v grafu závislosti $1/v_0$ na $1/[S]$.
- Pro kompetitivní inhibici platí upravená dvojnásobně reciproká rovnice dle Lineweavera a Burka:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{lim}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

- Přímky, které se získají vnesením v dvojnásobně reciprokém grafu při různých koncentracích inhibitoru, se protínají na ose $1/v_0$ v bodě $1/v_{lim}$ (Obr. 4).

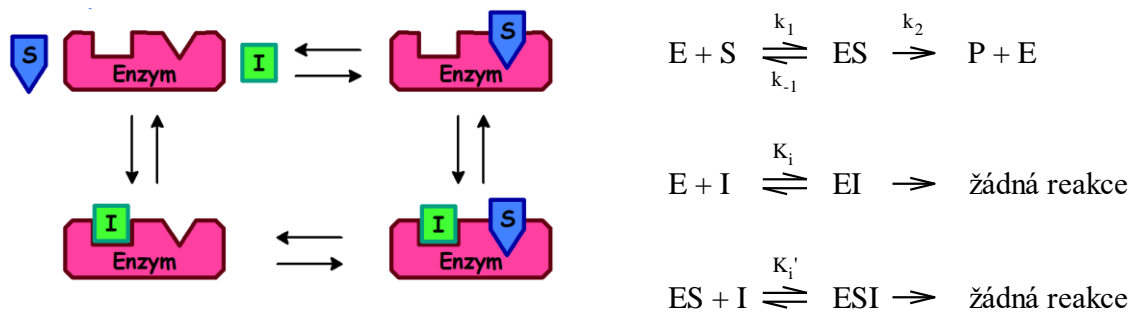


Obr. 4 Lineweaver-Burkův graf pro kompetitivně inhibovaný enzym.

- Kompetitivní inhibici (stupeň inhibice) je možné potlačit nadbytkem substrátu, V_{lim} se nemění, K_M roste.

1.2.2 Smíšená a nekompetitivní inhibice

V případě smíšené inhibice se inhibitor substrátu nepodobá, může se vázat na místo enzymu, které se účastní vazby substrátu nebo katalytického mechanismu. Inhibitor tvoří komplex s volným enzymem i s komplexem [ES] za vzniku [EI] a [ESI] (Obr. 5), které jsou katalyticky neúčinné. Oba kroky vazby inhibitoru jsou v rovnováze, ale liší se rovnovážnými konstantami. V případě, kdy se inhibitor váže se stejnou disociační konstantou na volný enzym i na komplex [ES], mluvíme o nekompetitivní inhibici.

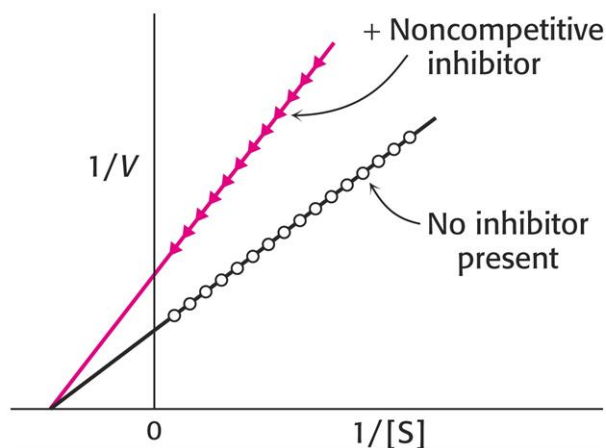


Obr. 5 Model nekompetitivní inhibice.

- Inhibiční konstanta je popsány vztahy $K_i = \frac{[E] \times [I]}{[EI]}$ a $K_i' = \frac{[ES] \times [I]}{[ESI]}$. Inhibiční konstanta při nekompetitivní inhibici udává takovou koncentraci nekompetitivního inhibitoru, při níž dochází k 50% inhibici enzymu.
- Pro nekompetitivní inhibici platí upravená dvojnásobně reciproká rovnice dle Linweavera a Burka:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{lim}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right)$$

- Přímký, které se získají vynesemím v dvojnásobně reciprokém grafu při různých koncentracích inhibitoru, se protínají na ose $1/[S]$ v bodě $-1/K_M$ (Obr. 6).

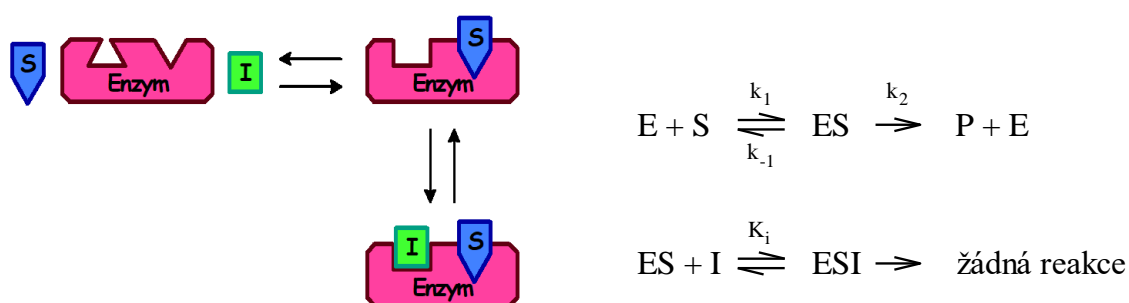


Obr. 6 Lineweaver-Burkův graf pro nekompetitivně inhibovaný enzym.

- Stupeň inhibice není ovlivňován koncentrací substrátu, V_{lim} se snižuje, K_M se nemění.

1.2.3 Akompetitivní inhibice

Akompetitivní inhibitor se váže až na vzniklý komplex $[ES]$, nikoliv na volný enzym, za vzniku komplexu $[ESI]$ (Obr. 7).

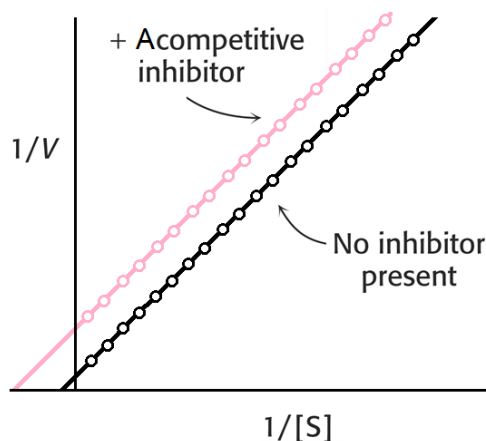


Obr. 7 Model akompetitivní inhibice.

- Inhibiční konstanta je popsána vztahem $K_i = \frac{[ES] \times [I]}{[ESI]}$ a udává koncentraci akompetitivního inhibitoru, při které se při plné saturaci enzymu substrátem aktivita enzymu sníží na polovinu.
- Pro akompetitivní inhibici platí upravená dvojnásobně reciproká rovnice dle Lineweavera a Burka:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{lim}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{lim}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

- Přímký, které se získají vynesemím v dvojnásobně reciprokém grafu při různých koncentracích inhibitoru, se neprotínají, jsou rovnoběžné (Obr. 8).



Obr. 8 Lineweaver-Burkův graf pro akompetitivně inhibovaný enzym.

- Akompetitivní inhibici není možné potlačit nadbytkem substrátu, stupeň inhibice se zvyšuje s rostoucí koncentrací substrátu, V_{lim} i K_M klesá, poměr K_M / V_{lim} se nemění.

1.3 Stanovení kinetických parametrů a charakteru inhibice

Charakter reversibilní inhibice a hodnota inhibiční konstanty se prakticky stanoví změřením rychlosti enzymové reakce při pěti různých koncentracích substrátu (kolem hodnoty K_M v rozsahu jednoho řádu) a v přítomnosti zvolené koncentrace inhibitoru. Změřená data se vynesou do grafu závislosti $1/v_0$ proti $1/[S]$. První přímka se získá stanovením rychlosti enzymové koncentrace při pěti různých koncentracích substrátu a v nepřítomnosti inhibitoru. Přímka protíná osu $1/v_0$ v bodě $1/v_{lim}$ a osu $1/[S]$ v bodě $-1/K_M$. Toto slouží pro grafické vyhodnocení základních kinetických parametrů daného enzymu, jako je limitní rychlost a Michaelisova konstanta. Další tři přímky získáme měřením v přítomnosti tří vhodně zvolených koncentrací inhibitoru. Pokud se jedná o čistou kompetici, protnou se všechny čtyři přímky v bodě $1/V_{lim}$. V případě nekompetitivního inhibitoru získáme svazek přímek, které se protínají na ose $1/[S]$. Pro akompetitivní inhibici je charakteristický graf se svazkem rovnoběžných přímek.

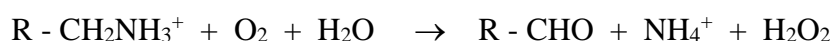
Pro vyhodnocení inhibiční konstanty je nutné sestavit sekundární graf. V případě kompetitivní a nekompetitivní inhibice se vynáší směrnice přímek z primárního grafu proti koncentraci inhibitoru (máme celkem čtyři koncentrace inhibitoru, včetně nulové). Získaná přímka se protíná s osou koncentrace inhibitoru v bodě K_i , což je inhibiční konstanta neboli disociační konstanta komplexu EI. V případě nekompetitivní inhibice lze sestavit i druhý sekundární graf, který se rovněž využívá při vyhodnocení inhibiční konstanty při akompetitivní inhibici, tj. vynesení průsečíků přímek primárního grafu s osou $1/v_0$ proti koncentraci inhibitoru. Při čisté nekompetitivní inhibici by se hodnoty obou takto získaných inhibičních konstant měly shodovat.

1.4 Aminoxidasy

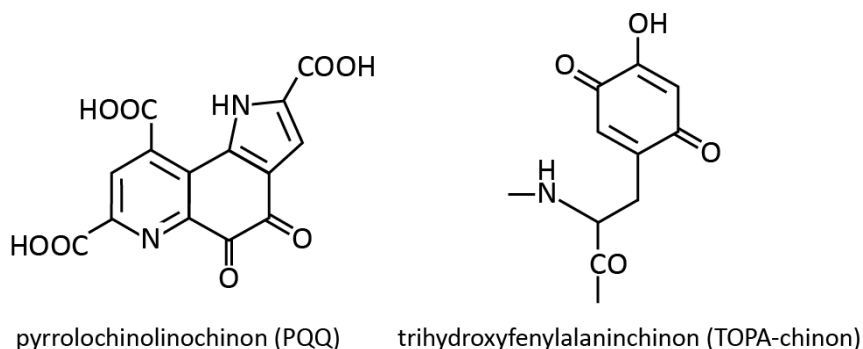
Aminoxidasy jsou obecně rozšířené enzymy, které lze dělit dle substrátové specifity do tří skupin:

- **monoaminoxidasy** (obsahující flavin), zkr. MAO, EC 1.4.3.4; amin:O₂ oxidoreduktasa (deaminační, obsahující flavin). Jsou obsaženy v krvi, mitochondriích a v celé řadě rostlinných čeledí, ale vždy ve velmi nízké aktivitě. Katalyzují oxidaci primárních aminů, obvykle také sekundárních a terciárních s malými substituenty.
- **aminoxidasy** (obsahující měď), zkr. AO, EC 1.4.3.6; amin:O₂ oxidoreduktasa (deaminační, obsahující měď). Jsou typické zejména pro placentu, kůru ledvin a bobovité rostliny jako hrách, sója, vojtěška, jetel, čočka apod.) Typickými substráty jsou diaminy putrescin (butan-1,4-diamin) a kadaverin (pentan-1,5-diamin), a proto jsou také někdy označovány jako diaminoxidasy (zkratka DAO).
- **polyaminoxidasy** (obsahující flavin), zkr. PAO, nemají zařazení v EC, jsou typické pro trávy a obilniny, substráty jsou spermin (*N,N'*-3-aminopropylputrescin) a spermidin (*N*-3-aminopropylputrescin).

Všechny aminoxidasy spotřebovávají k oxidaci substrátu kyslík a produkují peroxid vodíku, amonný ion a příslušný aldehyd:



Většina polyaminoxidas jsou flavoproteiny, obsahující jako kofaktor FAD. Organické kofaktory ostatních aminoxidas se podařilo identifikovat až v posledních letech. Některé mikrobiální aminoxidasy (např. methylaminoxidasa) obsahují kovalentně vázaný pyrrolochinolinochinon (zkratka PQQ), zatímco aminoxidasy (obsahující měď) mají jako kofaktor trihydroxyfenylalaninchinon (TOPA-chinon), který vzniká posttranslační modifikací peptidově vázaného tyrosinu (Obr. 9).

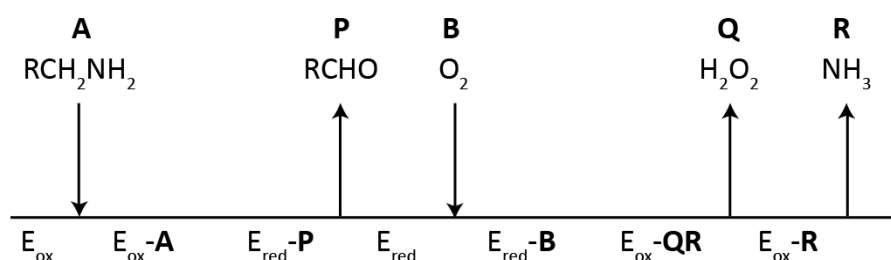


Obr. 9 Pyrrolochinolinochinon (PQQ), trihydroxyfenylalaninchinon (TOPA-chinon).

Vhodným enzymem pro potřeby laboratorního cvičení zaměřeného na problematiku enzymologie je enzym aminoxidasa izolovaný z klíčků hrachu (PSAO). PSAO má dimerní strukturu a obsahuje organický kofaktor TOPA-chinon a měď ve formě Cu(II) v každé z podjednotek. Relativní molekulová hmotnost PSAO v nativním stavu (dimer) je 150 kDa. Výchozím materiálem pro purifikaci rostlinných Cu-aminoxidas jsou nejčastěji etiolované 7–10 denní semenáčky. Purifikační metody zahrnují homogenizaci rostlinného materiálu ve vhodném pufru, hrubé přečištění extraktu, jeho zakoncentrování a řadu chromatografických postupů. Pro hrubé přečištění extraktu lze použít metody srážení balastních bílkovin síranem amonným, chloridem manganatým či protaminsulfátem nebo řízenou tepelnou denaturaci balastních bílkovin. Pro izolaci aminoxidas se využívá

chromatografie na celulosových iontoměničích, na hydroxyapatitu a gelová permeační chromatografie.

Pro stanovení aktivity aminoxidasy byla vypracována řada různě specifických a citlivých metod. Metoda, kterou budeme dále využívat je založena na spektrofotometrickém stanovení žlutohnědého zbarvení indukujícího aminoxidasovou reakcí vzniklý peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku je za přítomnosti peroxidasy (EC 1.11.1.6) a bezbarvého guajakolu (*o*-methoxyfenol) rozkládán na kyslík a vodu. Kyslík oxiduje guajakol za vzniku žlutohnědého tetraguajakolochinonu s absorpčním maximem při 436 nm. Nárůst absorbance při 436 nm v čase odpovídá vznikajícímu peroxidu vodíku a tedy aktivitě aminoxidasy. Vhodnými substráty aminoxidasy z klíčků hrachu jsou diaminy putrescin a kadaverin. Kadaverin je dokonce oxidován za přítomnosti aminoxidasy rychleji než putrescin, který je však běžnější a dostupnější. Aminoxidasa je dvousubstrátový enzym, prvním substrátem je diamin a druhým kyslík. Mechanismus aminoxidasové reakce má ping-pongový charakter, jak je naznačeno v Clelandově schématu. V anaerobní fázi reakce dochází nejdříve k reakci enzymu s aminoskupinou aminu (A), uvolní se odpovídající aldehyd (P) a vzniká redukovaná forma enzymu (E_{red}). Reakcí redukované aminoxidasy s molekulárním kyslíkem (B) dochází k uvolnění H_2O_2 (Q) a NH_3 (R), což je spojeno s reoxidací enzymu (E_{ox}) (Obr. 10).



Obr. 10 Clelandovo schéma bi-ter ping-pongového mechanismu aminoxidasové reakce.

Enzymovou reakci v aktivním místě aminoxidasy zprostředkovávají chinonový kofaktor a ion Cu^{2+} . Interakce chinonového kofaktoru s primární aminoskupinou substrátu vede k tvorbě kovalentní vazby a vzniku chinoketiminu. Zachycením α -protonu substrátu histidinovým zbytkem vzniká z chinoketiminu karbanion, který se velmi rychle mění na bezbarvý chinoaldimin. Po uvolnění aldehydu se v aktivním centru tvoří redukovaná forma kofaktoru, aminokatechol. Stav $Cu(II)$ -aminokatechol je v rovnováze s radikálovou formou $Cu(I)$ -semichinon, semichinolaminem. Jeho reakcí s molekulárním kyslíkem vzniká opět oxidovaná forma enzymu, uvolní se peroxid vodíku a amoniak.

Při dalších kinetických měřeních budeme uvažovat, že koncentrace kyslíku (vzduchu) je stálá po celou reakční dobu, reakční směs je nasycena vzduchem, a můžeme proto měnit koncentraci putrescinu a studovat K_m (Michaelisovu konstantu) stejně jako inhibitory ve vztahu k diaminu.

2 Praktická část

2.1 Stanovení základních kinetických parametrů a typu inhibice aminoxidasy

2.1.1 Vybavení

2.1.1.1 Přístroje

- Centrifuga, spektrofotometr.

2.1.1.2 Chemikálie

- Křenová peroxidasa, putrescin, hydrogenfosforečnan didraselný, dihydrogenfosforečnan draselný, guajakol, inhibitor = 3-aminopropionitrilfumarát.

2.1.1.3 Roztoky

- **0,01% křenová peroxidasa**
5 mg peroxidasy se rozpustí ve vodě a upraví se objem na 50 ml.
- **0,1 M K-fosfátový pufr pH 7**
5,45 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 12,23 g hydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí v 800 ml vody. Upraví se pH na hodnotu 7 a doplní na objem 1 l.
- **0,035 M guajakol**
196 mg guajakolu se rozpustí ve vodě a doplní do objemu 50 ml.
- **87,5 mM putrescin**
140,96 mg putrescinu se rozpustí ve vodě a doplní do objemu 10 ml. Zásobní roztok putrescinu se použije pro přípravu putrescinů o koncentracích 5,83; 7,00; 8,75; 11,66; 17,50 a 35,00 mM.
- **Enzym s aminoxidasovou aktivitou (přečištěný extrakt z hrachu)**
- **Inhibitor – 3-aminopropionitrilfumarát**
9 mg 3-aminopropionitrilfumarátu (Mw 128,13) se rozpustí ve 100 ml vody.

2.1.2 Postup

- Všechny roztoky (0,01% křenovou peroxidasu, enzym s aminoxidasovou aktivitou, inhibitor a 5,83 – 35,00 mM roztoky putrescinu) nechejte rozmraznout při pokojové teplotě.
- Přečištěný extrakt z hrachu po rozmrazení zcentrifugujte (5 minut, 12000 g) a supernatant přepipetujte do čisté mikrozkuhavky. Supernatant během měření chlaďte na ledu.
- Do kádinky si připravte reakční směs na 60 měření:
90 ml 0,1 M K-fosfátového pufru pH 7
1,5 ml 0,035 M guajakolu

1,5 ml 0,01% křenové peroxidasy

- Nastavte si spektrofotometr. Změna absorbance vzorků bude měřena při 436 nm po dobu 1 minuty.
- Všechna měření provádějte v jedné plastové kyvetě. Mezi jednotlivými měřeními je nutné kyvetu vyplachovat destilovanou vodou. Obsah kyvety během měření promíchejte.
- Do kyvety napipetujte dle rozpisu v tabulce 1 reakční směs, enzym s aminoxidasovou aktivitou (přečištěný extrakt hrachu), vodu a případně inhibitor. Tato směs slouží jako blank pro vynulování přístroje.
- Reakci startujte přidavkem putrescinu o známé koncentraci. Po přidavku putrescinu spusťte měření na spektrofotometru. Po 1 minutě si zaznamenejte změnu absorbance.
- V případě, že změna absorbance za 1 minutu je vyšší než 1, upravte po konzultaci s vyučujícím objem vzorku enzymu aplikovaný do reakční směsi, případně dobu měření.
- Naměřené hodnoty okamžitě zaznamenejte do grafu závislosti $1/v$ na $1/S$.
- Po změření první sady zkonzultujte dosažené výsledky s vedoucím cvičení.
- Na základě přesnosti měření vedoucí rozhodne, zda se stanovení bude opakovat. V případě schválení dosažených výsledků pokračujte v proměřování stejným způsobem druhé a třetí sady zkumavek.

Tabulka 1 Rozpis aplikace inhibitoru a substrátů o různé koncentraci při stanovení kinetických parametrů aminoxidasy.

Koncentrace putrescinu (mM)	Reakční směs (ml)	Aminoxidasa (ml)	Inhibitor (ml)	Voda (ml)	Startovat přídatkem putrescinu (ml)
První sada					
5,83	1,55	0,05	0	0,1	0,05
7,00	1,55	0,05	0	0,1	0,05
8,75	1,55	0,05	0	0,1	0,05
11,66	1,55	0,05	0	0,1	0,05
17,50	1,55	0,05	0	0,1	0,05
35,00	1,55	0,05	0	0,1	0,05
Druhá sada					
5,83	1,55	0,05	0,05	0,05	0,05
7,00	1,55	0,05	0,05	0,05	0,05
8,75	1,55	0,05	0,05	0,05	0,05
11,66	1,55	0,05	0,05	0,05	0,05
17,50	1,55	0,05	0,05	0,05	0,05
35,00	1,55	0,05	0,05	0,05	0,05
Třetí sada					
5,83	1,55	0,05	0,1	0	0,05
7,00	1,55	0,05	0,1	0	0,05
8,75	1,55	0,05	0,1	0	0,05
11,66	1,55	0,05	0,1	0	0,05
17,50	1,55	0,05	0,1	0	0,05
35,00	1,55	0,05	0,1	0	0,05

2.1.3 Vyhodnocení

- Výsledky měření vynesete do dvojnásobně reciprokého grafu. Namísto přepočtu absorbance na rychlost enzymové reakce vynesete v grafu naměřenou absorbanci (resp. její reciprokou hodnotu).
- Z grafu určete hodnotu K_m , V_{lim} , charakter inhibice.
- Vypracujte sekundární graf vynesetím směrnice přímek z primárního grafu na osu y proti koncentraci inhibitoru na ose x. Z grafu vyhodnoťte K_i .