

Dátum:
13.4.2007

Stanovenie Michaelisovej konštanty laktátdehydrogenázy

Anton Repko
BCHPV/2

Úvod

Laktátdehydrogenáza (EC 1.1.1.27) katalyzuje redoxnú rovnováhu laktátu a pyruvátu za prítomnosti NAD^+ . Pre laktát aj NAD^+ som stanovil Michaelisovú konštantu, t.j. koncentráciu substrátu, pri ktorej je rýchlosť polovičná oproti maximálnej rýchlosti. Substrát, voči ktorému som práve nestanovoval Michaelisovu konštantu, mal konštantnú koncentráciu vo všetkých vzorkách. Koncentráciu produktu som stanovoval pridaním 2,4-dinitrofenylhydrazínu, ktorý vytvára s produktom farebnú zlúčeninu, stanoviteľnú spektrofotometricky pri 505 nm. Maximálnu rýchlosť reakcie nebolo možné stanoviť, lebo nepoznám extinkčný koeficient vznikajúcej zlúčeniny, preto som do grafu vynášal absorbanciu, ktorá je priamo úmerná koncentrácií.

Koncentráciu laktátu/ NAD^+ v reakčnej zmesi som vypočítal podľa vzorca:

$$c = \frac{c_{\text{zásobný}}}{V_{\text{celkový}}} \cdot V_{\text{zásobný}}$$

Aparatúra

0,9 M laktát sodný, 3 mM NAD^+ , 0,1 Tris-HCl pufo (pH 9,0), 0,4 M NaOH
roztok dinitrofenylhydrazínu 0,1 g v 100 ml 2 M HCl roztok enzýmu: 4 mg LDH z hovädzieho srdca v 10 ml vody
spektrofotometer, termostatovaný vodný kúpeľ, automatická pipeta, skúmavky

Postup

Do skúmaviek som napipetoval roztoky podľa tabuľky:

č.skúm.	$V_{\text{laktát}}$ [ml]	V_{NAD^+} [ml]	V_{voda} [ml]	V_{pufo} [ml]
L1	0,01	0,15	0,09	0,10
L2	0,02	0,15	0,08	0,10
L3	0,04	0,15	0,06	0,10
L4	0,05	0,15	0,05	0,10
L5	0,10	0,15	0,00	0,10
N1	0,10	0,02	0,13	0,10
N2	0,10	0,05	0,10	0,10
N3	0,10	0,08	0,07	0,10
N4	0,10	0,10	0,05	0,10
N5	0,10	0,15	0,00	0,10
slepý	0,10	0,15	0,00	0,10

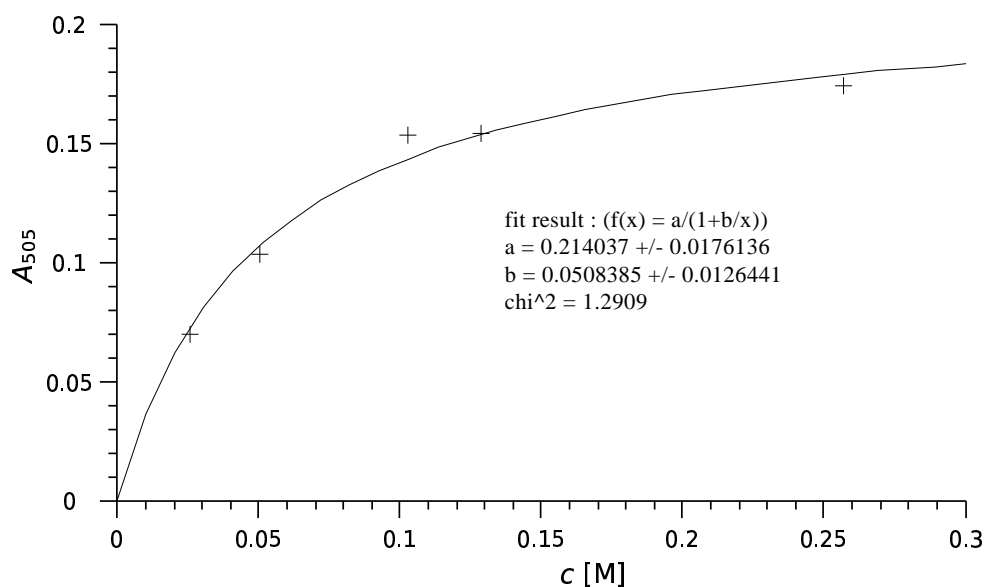
Skúmavky som umiestnil do termostatovaného vodného kúpeľa na 37°C. Ďalej som pripravil riedený roztok enzýmu z 0,5 ml roztoku LDH zriedením na 10 ml, ktorý som tiež nechal temperovať. Do jednotlivých skúmaviek som pipetoval v 30 sekundových intervaloch po 0,1 ml zriedeného roztoku enzýmu (okrem slepej vzorky) a presne po 15 minútach pridal po 0,25 ml roztoku dinitrofenylhydrazínu (aj do slepej vzorky). Do slepej vzorky som nakoniec pridal 0,1 ml zriedeného roztoku enzýmu. Po 20 minútach som do všetkých skúmaviek pridal po 2,5 ml roztoku NaOH. Po ďalších 20 minútach som meral absorbanciu pri 505 nm proti slepému pokusu.

Výsledky

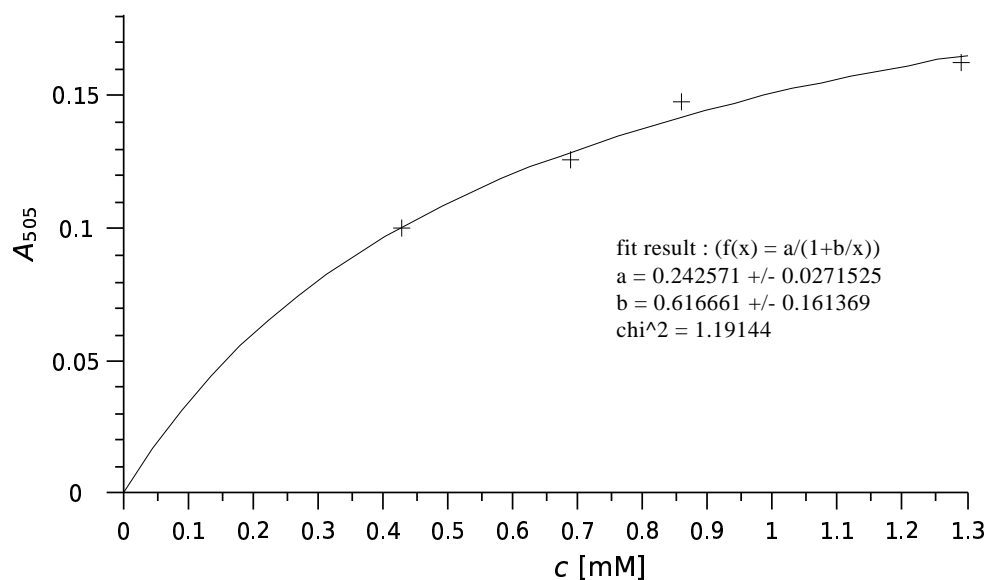
č.skúm.	$V_{\text{laktát}}$ [ml]	$c_{\text{laktát}}$ [M]	A_{505}	č.skúm.	V_{NAD^+} [ml]	c_{NAD^+} [mM]	A_{505}
L1	0,01	0,026	0,070	N1	0,02	0,17	0,200
L2	0,02	0,051	0,103	N2	0,05	0,43	0,099
L3	0,04	0,103	0,153	N3	0,08	0,69	0,125
L4	0,05	0,129	0,154	N4	0,10	0,86	0,147
L5	0,10	0,257	0,174	N5	0,15	1,29	0,162

Hodnota pre N1 je zjavne hrubá chyba, preto som ju z ďalších výpočtov vynechal. Výsledky sú vynesené v grafoch:

Závislosť rýchlosti reakcie na koncentrácii laktátu



Závislosť rýchlosti reakcie na koncentrácii NAD^+



Určené hodnoty Michaelisovej konštanty:

$$K_{m(\text{laktát})} = 0,05 \text{ M}$$

$$K_{m(\text{NAD}^+)} = 0,6 \text{ mM}$$

Odpovede na kontrolné otázky

1. Rýchlosť reakcie by sa dala sledovať ešte meraním absorbie vznikajúceho NADH pri 340 nm, prípadne nejakým druhom selektívnej redoxnej titrácie.
2. Nelineárna regresia lepšie zohľadňuje chyby stanovenia. Linearizovaný dvojnásobne recipročný výnos prikladá príliš veľkú váhu hodnotám nameraným pri nízkej koncentrácii, kedy je vysoká relatívna chyba určenia počiatočnej koncentrácie aj konečnej absorbie.