

Vaším úkolem je připravit 500 ml 50mM acetátového pufru o pH 6,0. Máte k dispozici 75 % kyselinu octovou (M_w 60,05 g/mol, $1,055 \text{ g/cm}^3$, pK_a 4,76) a octan sodný (M_w 82,0343 g/mol).

Vypracujte postup, podle kterého bude i laik schopen připravit tento pufr (navážky, objemy, postup).



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Purifikace isositrátdehydrogenasy z bakterie *Enterococcus* probíhala v čtyřech krocích. Po každém purifikačním kroku byla stejným způsobem proměřena její aktivita v získaných frakcích a rovněž změřena koncentrace proteinů viz. tabulka. Spočítejte stupeň přechištění a výtěžek purifikace.

Metoda	změřená aktivita s 50 μ l enzymu v reakční směsi [nkat]	V [ml]	c _{prot} [mg/ml]	výtěžek	stupeň přechištění
po dezintegraci	1	10	0,8		
srážení (NH ₄) ₂ SO ₄	1,2	7,5	0,48		
HIC	0,325	20	0,104		
GC	0,5	10	0,125		
AC	0,6	5	0,032		

Aktivita isocitrátdehydrogenasy byla měřena s využitím isocitrátu jako substrátu. Reakční směs obsahovala 0,2 μl vzorku isocitrátdehydrogenasy (koncentrace 4 mg/ml), 0,3 μl 20mM roztoku isocitrátu, 0,2 μl 30mM NAD^+ a 0,5 μl 50 mM Tris pufru pH 8,2. Reakce probíhala 5 minutu při 37 °C a byl sledován přírůstek absorbance v 1 cm kyvetě při 340 nm. Molární extinkční koeficient NADH při 340 nm je 6 220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Po odečtení slepého pokusu jste získali absorbanci 1,0. Jaká je aktivita a specifická aktivita isocitrátdehydrogenasy?



Nepihlášený host (1)

VŠCHT PRAHA