

Субстрат ингибирование ферментов с помощью Cobra SMARTsense



Химия

Органическая химия

Биохимия

Биология

Биохимия

Прикладные науки

Медицина

Биохимия



Уровень сложности

средний



Размер группы

2



Время подготовки

10 Минут



Время выполнения

45+ Минут

PHYWE
excellence in science

Общая информация

Описание

PHYWE
excellence in science

Экспериментальная установка

Ферментативный гидролиз мочевины в водном растворе дает углекислый газ и аммиак. Ионы этих соединений увеличивают проводимость раствора. Скорость гидролиза мочевины ферментом уреазой при различных концентрациях субстрата может быть определена путем измерения проводимости. В случае повышенных концентраций субстрата происходит ингибирование субстрата.

Дополнительная информация (1/4)

PHYWE
excellence in science

Предварительные

знания



Студенты и учащиеся должны быть знакомы с понятиями ингибирования субстрата, энзимолита мочевины и функцией ферментов.

Принцип



В случае повышенных концентраций субстрата происходит ингибирование субстрата.

Дополнительная информация (2/4)

PHYWE
excellence in science

Цель



Ученики и студенты должны понимать, что большое количество субстрата в случае ферментах приводит к обратимому торможению, поскольку субстраты пространственно препятствуют друг другу.

Задачи



Ученики и студенты должны измерить проводимость и скорость гидролиза мочевины ферментом уреазой при различных концентрациях субстрата.

Дополнительная информация (3/4)

PHYWE
excellence in science

Более подробная информация о результатах

- Высокий избыток субстрата приводит к обратимому ингибированию ферментов, т.е. скорость реакции больше не увеличивается с увеличением концентрации субстрата, а остается постоянной или даже снижается, поскольку молекулы субстрата взаимодействуют друг с другом в пространстве («ингибирование субстрата»).
- Для оценки определяется средняя скорость энзимолита между 100 с и 200 с после начала эксперимента. Для этого через каждые 100 с и 200 с необходимо рассчитывать разность между значениями электропроводности и разделить ее на 100 с. Эти скорости отложены в зависимости от концентрации мочевины (в ммоль / л). Концентрации субстрата рассчитываются на основе данных процентной концентрации по формуле: $C_s = (W * 10000) / M$, где

W = концентрация раствора мочевины в%,

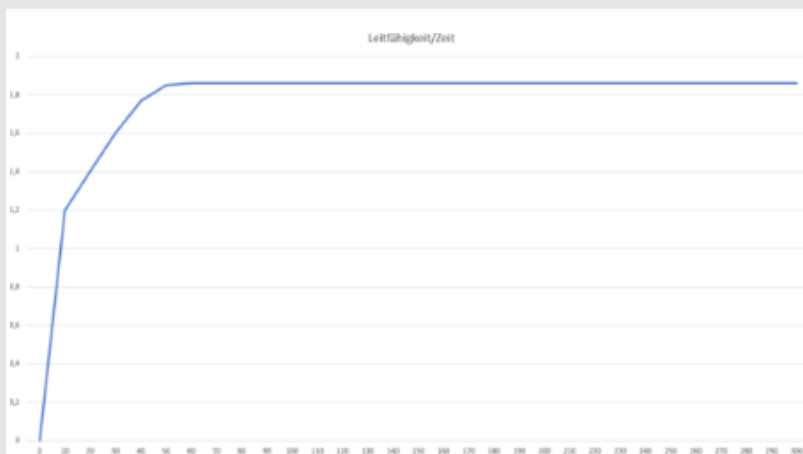
M = молярная масса мочевины = 60,06 г / моль

Дополнительная информация (4/4)

PHYWE
excellence in science

Примечания

Графический анализ может быть выполнен с помощью соответствующего программного обеспечения, например, Excel. Это позволяет оценить концентрацию, при которой происходит ингибирование субстрата (максимум на графике). Скорость реакции достигает максимума при концентрации мочевины около 40 ммоль / л. Затем происходит ингибирование субстрата.



Графическая оценка в Excel

Инструкции по технике безопасности

PHYWE
excellence in science

- К этому эксперименту применяются общие инструкции по безопасному проведению экспериментов при преподавании естественных наук.

Теория

PHYWE
excellence in science

Ферментативный гидролиз мочевины в водном растворе дает углекислый газ и аммиак. Ионы этих соединений увеличивают проводимость раствора. Скорость гидролиза мочевины ферментом уреазой при различных концентрациях субстрата может быть определена путем измерения проводимости. В случае повышенных концентраций субстрата происходит ингибирование субстрата.

Ингибирование этого субстрата является обратимым, т.е. его можно полностью изменить его. Ингибирование субстрата также характеризуется тем, что с увеличением концентрации субстрата скорость реакции больше не увеличивается, а скорее остается на определенном уровне.

Оборудование

Позиция	Материал	Пункт No.	Количество
1	Cobra SMARTsense - Проводимость, 0...20000 $\mu\text{S/cm}$, 0...100°C (Bluetooth)	12922-00	1
2	Магнитная мешалка, цилиндрическая, 30 мм	46299-02	1
3	Magnetic stirrer with heating, stainless steel, digital, 280 °C, 100-1500 rpm	FHO-RSM10HS	1
4	Манипулятор для магнитных мешалок	35680-03	1
5	Портативные весы, OHAUS PS121, 300 г / 0,01 г	49241-93	1
6	Подставка для штатива Бунзена, 210x130 мм, h=750 мм	37694-00	1
7	Двойная муфта	02043-00	1
8	Универсальный зажим	37715-01	1
9	Мензурка, высокая, 100 мл	46026-00	8
10	Мензурка, низкая, 250 мл	46054-00	1
11	Колба Эрленмейера, узкогорлая, 100 мл, SB19	36418-00	7
12	Резиновая пробка, d=22/17 мм, без отверстия	39255-00	7
13	Мерная пипетка, 20 мл	36579-00	1
14	Мерная пипетка, 50 мл	36581-00	1
15	Шаровая пипетка	36592-00	1
16	Микролитровый шприц, 100 мкл	02606-00	1
17	Шпатель, спец. сталь, l=150 мм	33393-00	1
18	Промывалка, пластмасса, 500 мл	33931-00	1
19	Мочевина, 250 г	30086-25	1
20	Уреаза, глицериновый раствор, 50%, 10 мл	31924-03	1
21	Вода, дистиллирован., 5 л	31246-81	1
22	measureAPP - бесплатное измерительное программное обеспечение всех пр	14581-61	1

Дополнительное оборудование

PHYWE
excellence in science

Позиция	Номер артикля.	Назначение
1		мобильное устройство (смартфон/планшет)
2	14581-61	measureAPP
3		Бумажные полотенца

PHYWE
excellence in science

Подготовка и выполнение работы

Подготовка (1/5)

PHYWE
excellence in science

Для измерения проводимости необходимы датчик Cobra SMARTsense и приложение measureAPP. Проверьте, активирован ли «Bluetooth» на Вашем устройстве (планшете, смартфоне) (приложение можно бесплатно загрузить в App Store - QR-коды ниже). Теперь откройте приложение measureAPP на своем устройстве.



measureAPP для

операционных систем Android



measureAPP для

операционных систем iOS

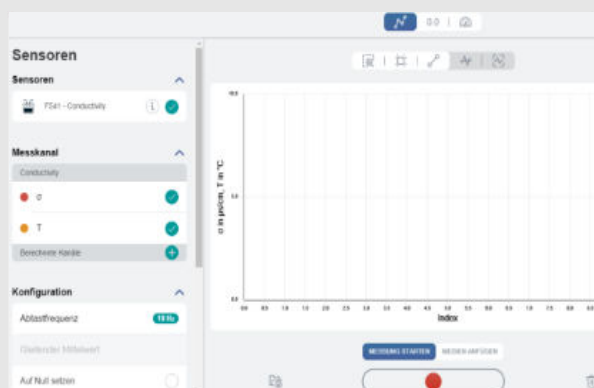


measureAPP для

Планшетов и ПК с Windows 10

Подготовка (2/5)

PHYWE
excellence in science



measureApp
в версии Windows 10

- Включите датчик проводимости SMARTsense, нажав и удерживая кнопку питания.
- Подключите датчик к устройству в приложении measureAPP в разделе «Измерение», как показано на рисунке слева.
- Датчик проводимости SMARTSense теперь отображается в приложении.

Подготовка (3/5)

PHYWE
excellence in science

Для проведения эксперимента требуются растворы с различными концентрациями мочевины. Они должны быть свежеприготовлены перед началом эксперимента:

- 1,6% раствор мочевины (основной раствор мочевины) Отмерьте 2 г мочевины в мензурку объемом 250 мл и растворите в 123,00 г дистиллированной воды.
- 0,8 % раствор мочевины: Перенесите 50 мл 1,6% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.
- 0,4% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,8% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.
- 0,2% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,4% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

Подготовка (4/5)

PHYWE
excellence in science

- 0,1% раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,2% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.
- 0,05 % раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,1% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.
- 0,025 % раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,05% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.
- 0,0125 % раствор мочевины: Перенесите 50 мл 0,025% раствора мочевины мерной пипеткой объемом 50 мл в колбу Эрленмейера объемом 100 мл и добавьте 50 мл дистиллированной воды.

Примечание: раствор мочевины **всегда следует хранить** в холодильнике!

Подготовка (5/5)

PHYWE
excellence in science

- Соберите экспериментальную установку, как показано на рисунке.
- Закрепите универсальный зажим на штативном стержне подставки Бунзена с помощью двойной муфты.
- Закрепите датчик проводимости SMARTsense универсальным зажимом.



Выполнение работы (1/2)

PHYWE
excellence in science

- Добавьте 40 мл 0,0125% раствора мочевины (сначала самая низкая концентрация) в мензурку объемом 100 мл путем двойного пипетирования с помощью мерной пипетки объемом 20 мл, затем поместите в мензурку стержень для магнитной мешалки
- Поместите стакан на магнитную мешалку и погрузите зонд проводимости в раствор.
- Установите мешалку на среднюю скорость перемешивания (внимание: магнитная мешалка не должна ударяться об электрод электропроводности).
- С помощью микролитрового шприца добавьте 50 мкл раствора уреазы и сразу начните измерение, нажав кнопку "Пуск".
- После завершения измерения сохраните данные для дальнейшей обработки.
- Таким же образом проводятся измерения со всеми восемью приготовленными растворами мочевины (в порядке возрастания).

Выполнение работы (2/2)

PHYWE
excellence in science

- При каждом отдельном измерении мензурка снимается с магнитной мешалки, а стержень магнитной мешалки удаляется из раствора с помощью стержня для удаления.
- Стержень магнитной мешалки необходимо тщательно промыть дистиллированной водой, ненадолго просушить бумажным полотенцем и поместить в следующий раствор.
- После каждого эксперимента зонд проводимости также следует промыть дистиллированной водой.

Чтобы определить концентрацию, с которой начинается ингибирование субстратом, определяются значения проводимости в моменты времени 100 с и 200 с и их разность и записываются для всех восьми проведенных измерений.

PHYWE
excellence in science

Протокол

Задача 1

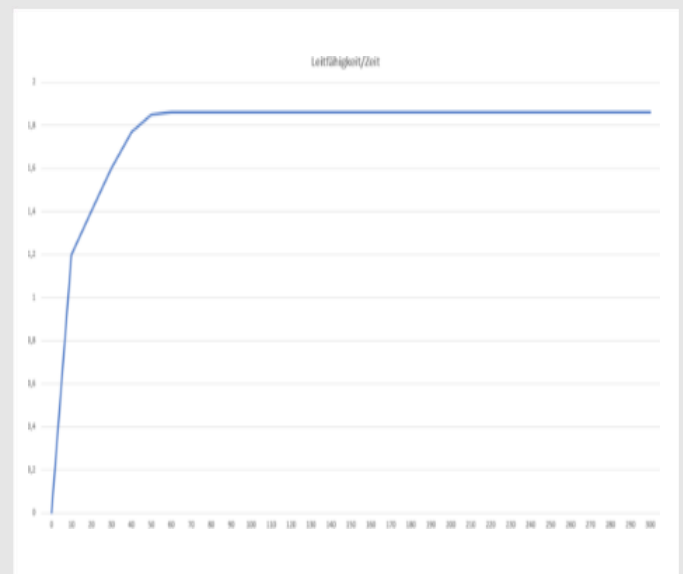
Заполните пробелы в тексте

Высокий [] приводит к [] ингибированию ферментов, т.е. скорость реакции [] не увеличивается с увеличением концентрации субстрата, а остается постоянной или даже снижается, поскольку молекулы субстрата [] друг с другом в пространстве («ингибирование субстрата»).

 Проверить

Задача 2

Примерно при какой концентрации мочевины происходит ингибирование субстрата?



Задача 3

Выберите правильные утверждения.

- Молярная масса мочевины 60,06 г / моль.
- Формула для концентрации субстрата: $C_s = (W \cdot 100) / M$
- Формула для концентрации субстрата: $C_s = (W \cdot 10000) / M$
- Высокий избыток субстрата приводит к необратимому ингибированию ферментов.

✓ Проверить

Слайд	Оценка / Всего
Слайд 20: Ингибирование субстрата	0/4
Слайд 21: концентрация карбамида	0/1
Слайд 22: Формула	0/2

Всего  0/7

👁 Решения

🔄 Повторить