

II rok BIOTECHNOLOGII**METABOLIZM ZWIĄZKÓW LIPIDOWYCH****Rok akademicki 2021/2022****INSTRUKCJE DO ĆWICZEŃ****Ekstrakcja związków o charakterze przeciwutleniaczy z materiału biologicznego.**

Przed rozpoczęciem ćwiczeń należy odebrać z pokoju przygotowawczego lub od kierownika ćwiczeń falkon a 50 ml. Przed ćwiczeniami należy zalać wybrane zioła (herbatę itp.) wrzącą wodą (w kubku lub szklance) i po kilku minutach wyjąć saszetkę. Napar przestudzić, przelać do falkonu i przynieść na ćwiczenia. Na każde zajęcia należy przynieść świeży napar.

Oprócz wykonania testów czynnościowych (zbadania wpływu otrzymanych ekstraktów na konkretny proces lub reakcję enzymatyczną) każdy zespół jest zobowiązany do wykonania analiz otrzymanych ekstraktów.

ANALIZY EKSTRAKTÓW:**Oznaczenia ilościowe****Całkowita zawartość związków polifenolowych**

Do probówki eppendorfa przenieść 50 μ l badanej próbki, 50 μ l odczynnika Folina-Ciocalteau (rozcieńczonego 1:1 wodą destylowaną, przygotowujemy taką ilość odczynnika, jaka zostanie zużyta do doświadczenia), 100 μ l 14% roztworu węgla sodowego i uzupełnić do 1 ml wodą destylowaną. Wymieszać. Po 25 minutach inkubacji w temp. pokojowej w ciemności próbki zwirować (jeżeli potrzebne) przez 5 min przy 7000 obrotów/min. Zmierzyć wartość absorbancji przy długości fali 720 nm wobec próby odczynnikowej. Ilość związków fenolowych wyrażoną w mg/ml ekstraktu obliczyć ze wzoru: $A_{720} \times 0,3707 - 0,0005$. Otrzymany wynik przeliczyć na gram suchej masy materiału wykorzystanego do przygotowania ekstraktów (pamiętać o obliczeniu odchylenia standardowego).

Całkowita zawartość flawonoidów

Do probówki eppendorfa przenieść 25 μ l badanego naparu, 0,4 ml metanolu, 25 μ l 10 % roztworu $AlCl_3 \times 6 H_2O$, 25 μ l 1 M roztworu CH_3COONa i 0,7 ml H_2O . Wymieszać. Pozostawić na stole laboratoryjnym na 40 minut. Po tym czasie zmierzyć absorbancję prób przy $\lambda = 415$ nm. Wiedząc, że 0,04 mg kwercetyny daje w warunkach testu $A_{415} = 0,483$ obliczyć ekwiwalent kwercetyny dla każdej próby badanej i podać w przeliczeniu na 1 g suchej masy poddanej ekstrakcji (pamiętać o obliczeniu odchylenia standardowego).

Całkowita zawartość kwasów fenolowych

1. Do probówki przenieść 50 μ l badanego naparu, 0,6 ml H_2O , 125 μ l 0,5 M roztworu HCl , 125 μ l odczynnika Arnova (10% wodny roztwór azotynu sodowego i molibdenianu sodowego) i 125 μ l 1 M $NaOH$. Wymieszać. Po 10 minutach zmierzyć absorbancję przy $\lambda = 490$ nm. Wiedząc, że krzywa standardowa wykonana w analogicznych warunkach dla kwasu kawowego wyrażona była funkcją o równaniu $y = 14,68x - 0,0109$ (na osi OX naniesiono mg kwasu kawowego) odczytać ekwiwalent kwasu kawowego dla każdego ekstraktu. Przeliczyć wyniki na 1 g suchej masy poddanej ekstrakcji (pamiętać o obliczeniu odchylenia standardowego).

Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej ekstraktów z materiału biologicznego metodą redukcji jonów żelaza(III) (antyoksydanty prewentywne, FRAP). Wyznaczanie IC₅₀.

Antyoksydanty na ogół są związkami redukującymi, stąd metody oznaczania ich zawartości w jakimś materiale często opierają się na pomiarze redukcji jakiegoś indykatora przez antyoksydanty. Antyoksydanty mogą redukować jony Fe³⁺ do Fe²⁺, które tworzą barwny kompleks z 2,4,6-tripirydylo-S-triazyną (TPTZ). Przyrost absorbancji tego kompleksu przy 593 nm jest miarą zawartości antyoksydantów w badanej próbce. Dodatkowo, niektóre przeciwutleniacze fenolowe posiadają zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych. Jon obecny w powstającym w tym procesie kompleksie jest niezdolny do zmiany stopnia utlenienia, co oznacza, że jest niezdolny do indukowania reakcji wolnorodnikowej.

Przygotować roztwór roboczy: zmieszać 0.3 M bufor octanowy pH 3.6, 10 mM roztwór 2,4,6-tripirydylo-S-triazyny w 40 mM HCl i 20 mM roztwór FeCl₃ w proporcjach 10:1:1. Do probówek typu eppendorfa odpipetować po 1150 µl roztworu roboczego, do jednej dodać 50 µl wody (próba odnośnikowa), do pozostałych po 50 µl badanych próbek (ekstraktów/naparów z materiału biologicznego), pamiętając, że w tej objętości powinny znajdować się różne ilości naparu/ekstraktu (ekstrakt/napar rozcieńczamy). Dokładnie wymieszać. Po 20 min zmierzyć absorbancję badanych próbek przy 593 nm względem próby odnośnikowej. Wykorzystując załączone dane (tabela obok) wykreślić krzywą standardową dla kwercetyny, przeliczyć uzyskane dla próbek wyniki na µmole kwercetyny i podać uśredniony odpowiednik kwercetyny (ekwiwalent kwercetyny) w przeliczeniu na 1 g suchej masy, pamiętając o obliczeniu wartości SD. Na podstawie uzyskanych danych wyliczyć IC₅₀.

Kwercetyna [µmole]	A ₅₉₃
0,00132	0,1531
0,0026	0,2698
0,004	0,4076
0,0053	0,5489
0,0066	0,6368

Pomiar całkowitego potencjału antyoksydacyjnego wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH (antyoksydanty interwentywne). Wyznaczanie IC₅₀.

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) przedstawia sumaryczną zdolność badanej substancji/mieszanki substancji do wymiatania wolnych rodników. DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) jest wolnym rodnikiem o stosunkowo dużej trwałości.

Roztwór DPPH[•] (Rys. 1a) ma barwę purpurową (wg. niektórych ciemnofioletową) o maksimum absorbancji w roztworze metanolowym przy długości fali λ = 515 nm, w czasie redukcji barwa ta stopniowo zmienia się na żółtą. W reakcji z substancją, która może oddać atom wodoru, tworzy formę zredukowaną DPPH (Rys. 1b) i wówczas zanika fioletowe zabarwienie roztworu. Spadek absorbancji po dodaniu antyoksydantów jest proporcjonalny do ilości formy utlenionej DPPH, jaka pozostaje w roztworze i jest miarą zdolności przeciwutleniaczy do zmiatania wolnych rodników.

Porównania zdolności antyoksydacyjnej substancji lub ich mieszanin (np. ekstraktów) dokonuje się przez określenie procentu zmiatania wolnych rodników zgodnie ze wzorem:

$$CPA (\% \text{ zmiatania DPPH}) = 100 \times (A_{\text{próby kontrolnej}} - A_{\text{próby badanej}}) / A_{\text{próby kontrolnej}}$$

a następnie przeliczeniu na podstawie krzywej standardowej (dane poniżej), jaka ilość mikromoli Troloxu wywiera podobny efekt, jak obserwowany dla badanego przeciwutleniacza lub ich mieszaniny (ekwiwalent Troloxu, TE, ang. Trolox equivalent). Trolox- nazwa handlowa kwasu 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksyłowego, rozpuszczalnej w wodzie pochodnej witaminy E. Jest to związek przyjęty jako umowny standard substancji o właściwościach antyoksydacyjnych, do której porównuje się wszystkie badane substancje o podobnych właściwościach, niezależnie od ich budowy chemicznej.

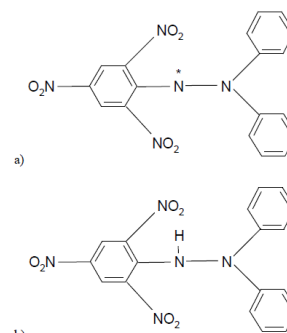
Roztwór DPPH: 0.15 mM DPPH w metanolu, roztwór gotowy do wykorzystania.

Substancja jest wrażliwa na światło, dlatego należy minimalizować ekspozycję zarówno odczynnika, jak i przygotowywanych próbek na światło.

Pomiar:

Do szeregu probówek eppendorfa przenieść 50 µl badanych ekstraktów lub naparów. Uzupełnić roztworem DPPH do 1.0 ml. Inkubować 15 min w ciemności (**w szafce, nie owijamy probówek folią aluminiową**). Spektrofotometr wyzerować na metanol. Po zakończeniu inkubacji odczytać A₅₁₅ próby kontrolnej (50 µl rozpuszczalnika, w którym znajdowała się badana substancja + 950 µl metanolowego roztworu DPPH) oraz prób badanych. Obliczyć wartość CPA dla każdej próby badanej. Wykorzystując załączone dane (tabela obok) wykreślić krzywą standardową dla Troloxu (krzywa zachowuje zależność liniową do wartości 95% CPA), przeliczyć uzyskane dla próbek wyniki CPA na µmole troloksu i podać uśredniony odpowiednik troloksu (ekwiwalent troloksu) dla każdej z badanych substancji, pamiętając o obliczeniu wartości SD.

Obliczyć, jaka ilość substancji (w postaci s.m.) wygasza połowę wolnych rodników DPPH (IC₅₀).

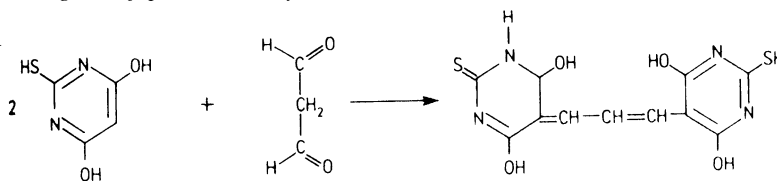


Rys. 1. DPPH: a) wolny rodnik, b) forma zredukowana

Trolox [µmole]	CPA [%]
9,2	10,7
24,1	24,2
51,6	51,4
79,7	78,3

Moduł I: Nieenzymatyczna peroksydacja lipidów jonami żelaza.

Podstawą metody jest powstawanie barwnego produktu reakcji kwasu tiobarbiturowego z niektórymi produktami peroksydacji lipidów (głównie z dialdehydem malonowym, powstającym z nietrwałych nadtlenków lipidów podczas ogrzewania mieszaniny reakcyjnej) w kwaśnym środowisku i podwyższonej temperaturze. Przebieg reakcji przedstawia Rys. 2.



Rys. 3. Schemat reakcji dialdehydu malonowego z kwasem tiobarbiturowym.

Powstający produkt ma różowe zabarwienie, a jego stężenie oznacza się spektrofometrycznie lub spektrofluorymetrycznie. Reakcja ta charakteryzuje się dużą czułością, jest jednak mało specyficzna. Istnieje bowiem szereg związków, które reagują w podobny sposób, dając produkty pochłaniające światło o zbliżonej długości fali. Sama reakcja również może powodować peroksydację lipidów, dlatego, aby wykluczyć tę możliwość i dokonać pomiaru poziomu peroksydacji lipidów przed reakcją, należy prowadzić oznaczenia w obecności BHT (2,6-di-t-butylo-p-krezol), jako przeciwutleniacza prewencyjnego, zapobiegającego utlenianiu lipidów przez odczynniki używane do oznaczeń.

II.1. Oznaczanie stopnia peroksydacji trójglicerydów.

5, 10, 15 μ l emulsyjnej postaci oleju lnianego dopełnić do 1 ml buforem 10 mM Tris-HCl, pH 7.4.

Dodać 2 ml odczynnika A i dokładnie wymieszać. Próby ogrzewać 10 minut w 100°C. Ilość powstałych produktów utleniania oznaczyć kolorymetrycznie przy $\lambda=535$ nm i obliczyć, ze wzoru: $A=\alpha \cdot c \cdot l$,

gdzie: A-absorbancja próby, c- stężenie molowe próby, l- długość drogi optycznej, wiedząc, że współczynnik ekstynkcji molowej (α) dla MDA wynosi 1.56×10^5 M⁻¹cm⁻¹.

II.2. Badanie zależności peroksydacji lipidów od stężenia induktora.

Do oznaczonej i wybranej z poprzedniego doświadczenia ilości emulsji dodać bufor 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 do objętości (1-V_{soli} Mohra), a następnie wzrastające ilości roztworu Fe²⁺ (do stężenia końcowego 1-25 mM) w postaci siarczynu (VI) żelazowo (II)-amonowego (soli Mohra). Inkubować przez 15 minut w temp. pokojowej. Po tym czasie oznaczyć ilość powstałych produktów peroksydacji jak w p. II.1.

II.3. Badanie wpływu obecności antyoksydantów na peroksydację lipidów w obecności jonów żelaza.

Do oznaczonej i wybranej z doświadczenia II.1. ilości emulsji dodać taką objętość buforu 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, aby po uzupełnieniu ekstraktem, a następnie solą Mohra objętość próby wynosiła 1 ml. Dodać następnie wzrastające stężenia roztworu przeciwutleniacza (otrzymane ekstrakty z produktów naturalnych, 3 stężenia). Po 10 min inkubacji dodać do prób roztwory soli Mohra do końcowego stężenia wyznaczonego w doświadczeniu II.2. i inkubować przez 10 minut w temp. pokojowej. Po tym czasie oznaczyć ilość powstałych produktów peroksydacji jak w p. II.1.

Proszę zastanowić się, jakie próby kontrolne należy przygotować.

Moduł II: Wpływ wolnych rodników na zdolność związków fluoryzujących do emisji światła.

Badanie wpływu wolnych rodników na zdolność związków fluoryzujących do emisji światła

Sondy fluorescencyjne: wodny roztwór piraniny (0.1 ml/ml)

Induktor utleniania: AAPH (wodny roztwór o stężeniu 30 mg/ml).

W kuwecie spektrofotometrycznej umieścić 2.5 ml 10 mM buforu Tris-HCl pH 7.4 i znaną ilość sondy fluorescencyjnej (ilość dobieramy eksperymentalnie). Dodać znane stężenie roztworu AAPH i przeprowadzić pomiary fluorescencji co 15 sekund przez 1.5 minuty. Następnie pomiar powtórzyć dla zmniejszających się stężeń (mniejszych objętości) AAPH. Wykreślić wykres zależności fluorescencji w funkcji czasu dla różnych stężeń induktora. Wykres przekształcić do postaci umożliwiającej odczytanie wartości IC_{50} .

Badanie wpływu ekstraktów na wygaszanie fluorescencji piraniny przez AAPH.

W kuwecie spektrofotometrycznej umieścić 2.5 ml 10 mM buforu Tris-HCl pH 7.4 i znaną objętość sondy fluorescencyjnej (stosowaną w poprzednim doświadczeniu). Przez 1.5 minuty (co 15 sekund) dokonywać pomiaru fluorescencji sondy (badamy fotowrażliwość piraniny), a następnie dodać znaną ilość badanego ekstraktu i dokonać pomiaru fluorescencji (Ex 454, Em 520) co 15 sekund przez 1.5 minuty. Następnie dodać do tej samej próby taką objętość roztworu AAPH, która w poprzednim doświadczeniu powodowała połowiczne wygaszenie piraniny. Dokonać pomiaru fluorescencji (Ex 454, Em 520) co 15 sekund przez 1.5 minuty (cały eksperyment prowadzimy w tej samej kuwecie).

Sposób opracowania wyników zostanie przedstawiony podczas ćwiczeń.

Proszę zastanowić się, jakie próby kontrolne należy przygotować.

Moduł III: Enzymatyczna peroksydacja lipidów przez lipooksygenazy.

I.1. Izolacja enzymu (*enzym zostanie przygotowany przez prowadzącego, obowiązuje Was znajomość procedury*).

Odważyć w zlewkach po 5 g mąki sojowej, z grochu, fasoli białej, lnu lub soczewicy. Mąkę zalać acetonem (0.5 cm powyżej poziomu mąki) i ekstrahować 10 min (mieszając bagietką) w celu odłuszczenia. Przesączyć. Mąkę obecną na sączku wysuszyć. Suchą, odłuszczoną mąkę zalać wodą destylowaną i ekstrahować enzym przez 15 minut, mieszając zawiesinę mąki w wodzie. Nadsącz (ciecz nad osadem) odwirować, co najmniej jednokrotnie, w wirówce stołowej przy maksymalnych obrotach. Supernatant przechowywać w lodówce.

I.2. Przygotowanie substratu (*substrat zostanie przygotowany przez prowadzącego, obowiązuje Was znajomość procedury*).

Do 7.1 ml 1% roztworu kwasu linolowego w metanolu dodać 0.25 ml detergentu Tween-20. Odparować rozpuszczalnik w wyparce próżniowej i zawiesić powstały film lipidowy w 100 ml 0.05 M Na_2HPO_4 . Doprowadzić pH roztworu do 9.0 używając 1 M NaOH (jako indykatora zmian używamy papierka wskaźnikowego). Do badań rozcieńczyć 10x.

UWAGA: Proszę starannie opisać przygotowany substrat, grupa, która jako pierwsza wykonuje to ćwiczenie przygotowuje substrat dla wszystkich pozostałych grup.

I.3. Badanie zależności aktywności lipooksygenazy od stężenia enzymu w próbie

Produkt reakcji lipooksygenazy zawiera w cząsteczce układ wiązań sprzężonych (substrat posiada układ wiązań izolowanych), o maksimum absorpcji przy $\lambda=233$ nm. Obserwując wzrost absorbancji przy tej długości fali możemy wykreślić krzywą kinetyczną reakcji utlenienia lipidów przez lipooksygenazy oraz oznaczyć aktywność tych enzymów.

Do kuwety spektrofotometrycznej dodać 2.4 ml roztworu substratu, aparat wyzerować dla $\lambda=233$ nm, reakcję zainicjować przez wstrzyknięcie kolejno od 20 do 100 μl roztworu enzymu. Dla każdej dodanej ilości r-ru enzymu śledzić zmiany absorbancji przez 3 minuty. Jeżeli prostoliniowy odcinek krzywej kinetycznej jest obserwowany przez co najmniej 90 sekund od rozpoczęcia reakcji, jako jednostkę aktywności enzymu przyjąć taką jego ilość, która powoduje w czasie 1 min wzrost absorbancji o 0.001 jednostki. Jednostka ta jest równa utlenieniu 0.12 μmola kwasu linolowego. Podać aktywność enzymatyczną otrzymanego preparatu. Jeżeli prostoliniowy odcinek krzywej kinetycznej jest obserwowany przez krótszy czas, szybkość początkową reakcji obliczyć z nachylenia początkowego odcinka krzywej kinetycznej reakcji ($\text{tg } \alpha$).

Wybrać rodzaj enzymu (LOX sojowa, grochowa czy też inna) oraz jego ilość wykorzystywaną w dalszych eksperymentach.

UWAGA: roztwór enzymu wykazuje stosunkowo duże pochłanianie światła przy długości fali 233 nm. Dlatego należy eksperymentalnie dobrać ilość dodawanego enzymu, rozcieńczając go w taki sposób, aby po zakończeniu reakcji obserwowana A_{233} mieściła się w zakresie wynikającym z prawa Lamberta-Beera!!

I.4. Badanie wpływu inhibitorów na aktywność LOX.

Do próbki przenieść niewielką ilość naparu dodać taką ilość roztworu substratu, aby końcowa objętość próby wynosiła 2.4 ml. Inkubować 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym zainicjować oraz przeprowadzić reakcję enzymatyczną jak w doświadczeniu I.3. Podać procentową zależność szybkości reakcji enzymatycznej w obecności przeciwutleniacza w stosunku do szybkości reakcji w jego nieobecności. Doświadczenie należy wykonać dla co najmniej dwu różnych objętości naparu.