

Laboratorium z biochemii

DLA STUDENTÓW BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA

Praca zbiorowa pod redakcją *Antoniego Polanowskiego*
Poprawki do wydania III wprowadzone pod redakcją
Justyny Ciuraszkiewicz i Elżbiety Gocek

4. ENZYMY

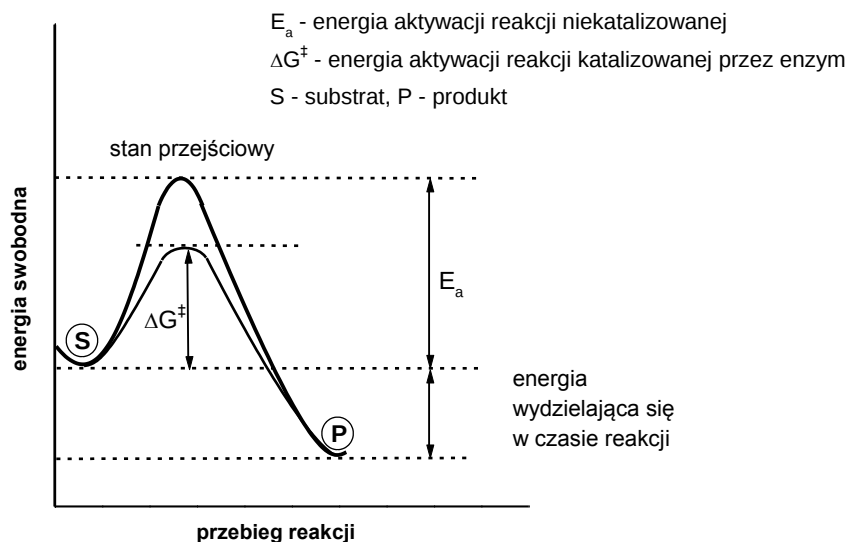
Autorzy: Jolanta Kowalska, Daniel Krowarsch, Irena Lorenc-Kubis, Dorota Nowak, Antoni Polanowski, Agata Sokołowska, Agata Szalewicz, Anna Wilimowska-Pelc, Zdzisław Wróblewski, Justyna Ciuraszkiewicz (ed. Justyna Ciuraszkiewicz)

4.1	Klasyfikacja i nomenklatura enzymów	6
4.2	Szybkość reakcji enzymatycznej	7
4.3	Sposoby określania aktywności enzymu	8
4.4	Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznej	9
4.4.1	Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji enzymatycznej	9
4.4.2	Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji enzymatycznej	11
4.4.3	Wpływ temperatury na szybkość reakcji enzymatycznej	11
4.4.4	Wpływ pH na szybkość reakcji enzymatycznej	12
4.4.5	Wpływ inhibitorów na szybkość reakcji enzymatycznej	13
4.4.5.1	Kinetyczne rozróżnianie inhibicji kompetycyjnej i niekompetycyjnej	15
4.4.6	Aktywatory enzymów	16
4.5	Trypsyna	17
4.5.1	Wpływ stężenia trypsyny na szybkość degradacji kazeiny	17
4.5.2	Wykazywanie aktywności trypsyny wobec kazeiny i wpływ inhibitora na jej aktywność	18
4.5.3	Oznaczanie aktywności trypsyny wobec p-nitroanilidu N-benzoilo-DL-argininy (BAPNA)	19
4.5.4	Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji katalizowanej przez trypsynę	20
4.5.5	Wpływ stężenia BAPNA na szybkość reakcji katalizowanej przez trypsynę	21
4.5.6	Wpływ pH na aktywność trypsyny	22
4.5.7	Wpływ temperatury na szybkość reakcji katalizowanej przez trypsynę	23
4.5.8	Termostabilność trypsyny	24
4.6	Trypsyna i chymotrypsyna – kinetyka enzymatyczna	24
4.6.1	Parametry kinetyczne (K_M , k_{kat} , k_{kat}/K_M) hydrolizy BAPNA katalizowanej przez trypsynę	24
4.6.2	Wyznaczanie stężenia BPTI przez miareczkowanie mianowanym roztworem trypsyny	27
4.6.3	Pomiar równowagowej stałej asocjacji (K_a) oddziaływania α -chymotrypsyna-BPTI	28
4.6.4	Modyfikacja trypsyny i chymotrypsyny za pomocą PMSF i TLCK	31

4.7	Fosfatazy	33
4.7.1	Preparacja fosfatazy kwaśnej z bulw ziemniaków	34
4.7.2	Identyfikacja aktywności fosfatazy kwaśnej w elektroforogramach	37
4.7.3	Oznaczanie aktywności fosfataz kwaśnych i zasadowych	38
4.7.3.1	Oznaczanie aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy krwi	38
4.7.3.2	Oznaczanie aktywności fosfatazy kwaśnej wobec fosforanu p-nitrofenolu metodą nieciągłą	39
4.7.3.3	Przyrost ilości produktu w czasie reakcji katalizowanej przez fosfatazę kwaśną	42
4.7.3.4	Oznaczanie aktywności fosfatazy kwaśnej wobec 1-naftylofosforanu metodą ciągłą	42
4.7.4	Fosfataza kwaśna – kinetyka enzymatyczna	44
4.7.4.1	Przygotowanie roztworu enzymu	44
4.7.4.2	Wpływ stężenia fosfatazy kwaśnej na szybkość reakcji enzymatycznej	44
4.7.4.3	Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji katalizowanej przez fosfatazę kwaśną	45
4.7.4.4	Hamowanie fosfatazy kwaśnej jonami miedzi, jonami fosforanowymi i winianem sodu	46
4.7.4.5	Wpływ pH na aktywność fosfatazy kwaśnej	47
4.7.4.6	Wpływ temperatury na aktywność fosfatazy kwaśnej	47
4.7.4.7	Określanie termo stabilności fosfatazy kwaśnej	48
4.8	Fosfataza zasadowa – kinetyka enzymatyczna	48
4.8.1	Hamowanie fosfatazy zasadowej przez NaH_2PO_4 i L-Phe	49
4.8.2	Jony Mg^{2+} jako aktywator fosfatazy zasadowej	50
4.9	Amylazy	51
4.9.1	Oznaczanie aktywności α -amylazy ślinowej metodą Bernfelda	51
4.10	Rybonukleaza trzustkowa	53
4.10.1	Ekstrakcja rybonukleazy z trzustki do 5% kwasy trichlorooctowego	55
4.10.2	Oznaczanie aktywności rybonukleazowej zmodyfikowaną metodą Anfinsena	55
4.11	Oksydoreduktazy	56
4.11.1	Izolacja mitochondriów z wątroby kurczęcia	57
4.11.2	Wykazywanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej we frakcji mitochondrialnej	58
4.11.3	Oznaczanie aktywności oksydazy cytochromu c we frakcji mitochondrialnej	59
4.11.4	Dehydrogenaza alkoholowa	61
4.11.4.1	Izolacja dehydrogenazy alkoholowej z komórek drożdży	61
4.11.4.2	Oznaczanie aktywności dehydrogenazy alkoholowej	63
4.11.5	Katalaza	64
4.12	Aminotransferazy	65
4.12.1	Wykazywanie aktywności ALT w kiełkach lucerny z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej	65
4.12.2	Oznaczanie aktywności ALT kolorymetryczną metodą Reitmana-Frankela w ekstrakcie z kiełków lucerny	67

Enzymy to katalizatory reakcji chemicznych zachodzących w organizmach żywych. W ich obecności katalizowana reakcja może przebiegać 10^6 – 10^{12} razy szybciej. Dzieje się tak dlatego, że enzymy posiadają zdolność obniżania energii aktywacji cząsteczek, czyli minimalnej energii potrzebnej do przebiegu reakcji chemicznej i przeprowadzenia cząsteczek w stan aktywny, co jest konieczne do wytworzenia lub rozerwania wiązania chemicznego (Rys. 4.1).

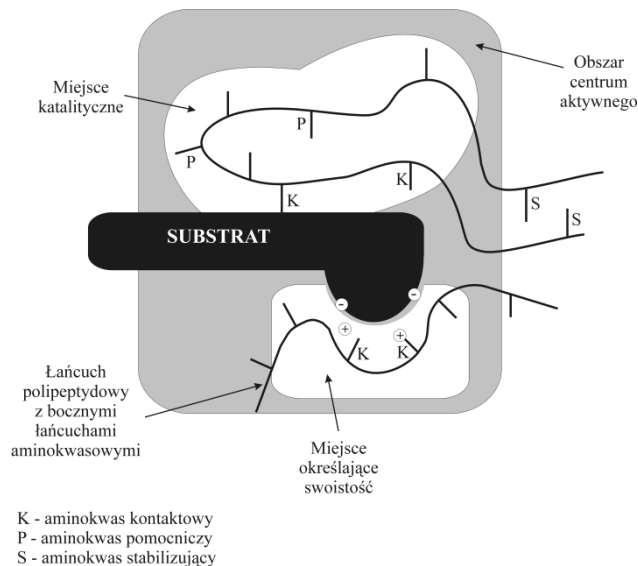
Enzymy charakteryzują się specyficznością wobec typu katalizowanej reakcji lub substratu tzn. katalizują tylko określone reakcje biochemiczne z udziałem określonych substratów.



Rys.4.1. Porównanie reakcji niekatalizowanej i katalizowanej enzymatycznie

Niemal wszystkie enzymy, za wyjątkiem rybozymów (cząsteczki RNA o właściwościach katalitycznych), są białkami. Mogą mieć budowę monomeryczną tzn. posiadają jeden łańcuch polipeptydowy lub oligomeryczną – są zbudowane z dwóch lub więcej podjednostek będących odrębnymi łańcuchami białkowymi. W wielu przypadkach poza częścią białkową posiadają dodatkowo części nie będące białkami. Takie enzymy o złożonej budowie noszą nazwę holoenzymów. Ich część białkowa to apoenzym, natomiast część niebiałkowa w zależności od sposobu związania z białkiem enzymu nosi nazwę grupy prostetycznej lub koenzymu. Grupa prostetyczna jest ściśle związana z białkiem enzymu (np. układy hemowe, stanowiące centrum katalityczne enzymów oksydacyjno-redukcyjnych), natomiast koenzym może występować samodzielnie i łączy się z apoenzymem w trakcie katalizowanej reakcji (np. witaminy i ich pochodne, pochodne nukleotydów lub jony nieorganiczne). Żadna z części składowych enzymu złożonego nie wykazuje aktywności oddzielnie. Zadaniem koenzymów lub grup prostetycznych jest bezpośrednie oddziaływanie z substratem lub udział we właściwym usytuowaniu substratu w centrum aktywnym, co jest niezbędne do zajścia reakcji enzymatycznej. Niektóre enzymy, katalizujące sprzężone ze sobą reakcje chemiczne, występują w organizmach w formie kompleksów wieloenzymowych.

Charakterystyczną cechą enzymów jest obecność w ich strukturze tzw. **centrum aktywnego** (Rys. 4.2). Jest to obszar cząsteczki, biorący udział w wiązaniu substratów i ich swoistym przekształcaniu. Grupy funkcyjne aminokwasów tworzących centrum aktywne zwykle nie należą do aminokwasów zajmujących kolejne miejsca w liniowej sekwencji łańcucha polipeptydowego. Pochodzą one od reszt aminokwasów niekiedy znacznie oddalonych, sąsiadujących ze sobą wskutek określonego przestrzennego ukształtowania łańcucha białkowego.



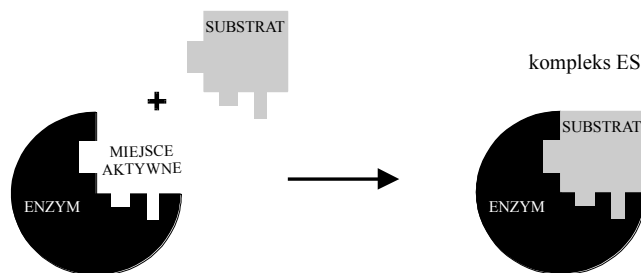
Rys.4.2. Budowa centrum aktywnego wg Koshlanda

W centrum aktywnym można wyróżnić grupy aminokwasów pełniących różne role w katalizowanym procesie, są to:

- **aminokwasy kontaktowe**, których jeden lub więcej atomów jest oddalony od substratu na odległość odpowiadającą przeciętnej długości wiązania chemicznego; należą do nich aminokwasy wiążące substrat oraz biorące bezpośredni udział w katalizie
- **aminokwasy pomocnicze**, które nie stykając się z substratem, pełnią jednak określoną rolę w czynności katalitycznej enzymu, właściwie orientując substrat

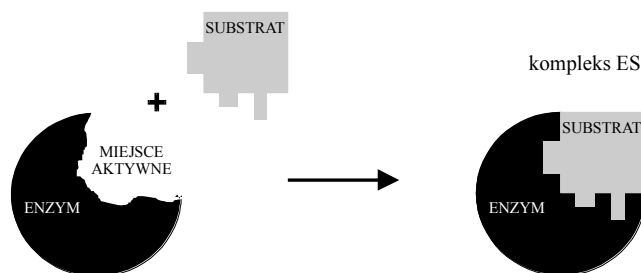
Oprócz aminokwasów tworzących centrum aktywne, w cząsteczce enzymu występują aminokwasy stabilizujące jego strukturę przestrzenną oraz aminokwasy nie biorące udziału w stabilizacji budowy przestrzennej ani w funkcji katalitycznej. W obszarze centrum aktywnego wyróżnia się miejsce wiązania substratu, czyli miejsce określające specyficzność enzymu oraz miejsce katalityczne, czyli miejsce, w którym zachodzi katalizowana reakcja.

Specyficzność wiązania substratu przez enzym zależy od precyzyjnie określonego ułożenia atomów w miejscu aktywnym. Substrat musi mieć odpowiedni kształt, by mógł pasować do miejsca aktywnego. **Model E. Fischera** zakłada, że kształt miejsca aktywnego wolnego enzymu jest komplementarny do kształtu substratu i pasuje jak klucz do zamka (Rys. 4.3).



Rys. 4.3. Model oddziaływania substratu z cząsteczką enzymu wg Fischera

Model Koshlanda – wymuszonego dopasowania enzymu do substratu – zakłada natomiast, że cząsteczka substratu zbliżająca się do obszaru enzymu zawierającego aminokwasy kontaktowe i pomocnicze wymusza zmianę konformacyjną tej części enzymu. Utworzenie prawidłowej konformacji centrum aktywnego, warunkującej czynność katalityczną, możliwe jest tylko pod wpływem swojego substratu (Rys. 4.4).



Rys. 4.4. Model wymuszonego dopasowania w oddziaływaniu substratu z cząsteczką enzymu wg Koshlanda

Enzymy są cząsteczkami labilnymi, dlatego mogą łatwo tracić swą katalityczną aktywność. Zniszczenie struktury fragmentów cząsteczki odpowiedzialnych za aktywność enzymu powoduje spadek lub całkowitą utratę jego aktywności, czyli **inaktywację**. Może to wystąpić m.in. wskutek zablokowania centrum aktywnego enzymu, degradacji cząsteczki lub zniszczenia struktury przestrzennej, czyli denaturacji. Denaturację enzymów powodują wszystkie czynniki chemiczne i fizyczne denaturujące białka. Zjawisko denaturacji białek, w tym również enzymów, zostało szczegółowo omówione w rozdziale 3.6. W pracy z roztworami enzymów należy również pamiętać, że do ich denaturacji prowadzi energiczne wytrząsanie i mieszanie roztworów.

Szybkość inaktywacji enzymów zależy od stężenia białka. Z reguły enzymy są mniej stabilne w roztworach o dużym rozcieńczeniu. Wiele enzymów przechowywanych w roztworze w stanie zamrożenia inaktywuje się po kilkukrotnym rozmrożeniu i ponownym zamrożeniu. Zaleca się więc zamrażać roztwór enzymu w odpowiednio małych porcjach, wystarczających do przeprowadzenia jednego doświadczenia. Ujemny wpływ czynników powodujących inaktywację enzymów można zmniejszyć poprzez dodawanie stabilizatorów. Mogą to być m.in. białka (np. 0,5–1% albumina osocza), wielocukry (np. dekstran o masie cząsteczkowej około 40 kDa), glikol polietylenowy lub glicerol (w stężeniu 20–50%). Poza tym stabilizatorami niektórych enzymów mogą być sole nieorganiczne (np. siarczan (VI) amonu).

Jak wspomniano na początku tego rozdziału, pewna grupa cząsteczek nie będących białkami, również wykazuje właściwości biokatalityczne. Są to cząsteczki RNA nazywane rybozymami. Katalityczny RNA, podobnie jak białka enzymatyczne, ma zdolność zwiększania szybkości reakcji chemicznej, wykazuje specyficzność substratową, charakteryzuje się specyficzną strukturą łańcucha rybonukleinowego i można w jego budowie wyróżnić centrum aktywne. Przykładami rybozymów mogą być introny zdolne do samodzielnego wycinania się z pre-mRNA, pre-rRNA czy pre-tRNA (proces ten może być odwracalny). Rybozomy mogą również wykazywać:

- aktywność endorybonukleazową w stosunku do innych (obcych) jednoniciowych cząsteczek RNA,
- aktywność endonukleazową, tnąc jednoniciowy DNA (efektywność tej reakcji jest znacznie niższa niż dla substratów RNA),
- aktywność polimerazy RNA, przyłączając nukleotydy komplementarne do zewnętrznej matrycy lub też do jednej z własnych podjednostek; ta właściwość rybozymów świadczy o zdolności niektórych cząsteczek RNA do samoreplikacji.

4.1 KLASYFIKACJA I NOMENKLATURA ENZYMÓW

Szybki rozwój enzymologii oraz wzrastająca liczba poznawanych enzymów wymusiły wprowadzenie jednolitego systemu ich nazewnictwa. Było to podyktowane faktem, że w wielu przypadkach te same enzymy były znane pod kilkoma nazwami lub różnym enzymom nadawano te same nazwy. W związku z tym Komisja Enzymowa Międzynarodowej Unii Biochemicznej w latach 1956–1972 opracowała dokładny, opisowy i informacyjny system klasyfikacji enzymów. Za podstawę klasyfikacji i nazewnictwa przyjęto rodzaj katalizowanej przez enzymy reakcji chemicznej. Enzymy zostały podzielone na sześć głównych klas, w obrębie których wyróżniono kilka podklas, dodatkowo podzielonych na pod-podklasy (Tab. 4.1).

Zasady klasyfikacji enzymów znajdują odzwierciedlenie w nadawanych im systematycznych numerach kodowych (EC, ang. Enzyme Commission), złożonych z czterech członów liczbowych oddzielonych od siebie kropkami. Numer klasyfikacyjny jednoznacznie wskazuje określony enzym.

Przykładowo numer EC 3.2.1.1 oznacza α -amylazę (jeden z enzymów hydrolizujących skrobię).

- Pierwsza cyfra w numerze kodowym EC tego enzymu oznacza przynależność do 3 klasy enzymów – hydrolaz – i charakteryzuje typ reakcji katalizowanej przez ten enzym.
- Druga cyfra oznacza podklasę 2, w której znajdują się enzymy działające na związki glikozylowe.
- Trzecia cyfra określa pod-podklasę 1 i precyzuje bliżej typ hydrolizowanego wiązania (O-glikozydowe).
- Czwarta cyfra numeru klasyfikacyjnego jest kolejnym numerem danego enzymu w jego podklasie.

Tab. 4.1. Klasyfikacja enzymów

klasa główna	typ katalizowanej reakcji	kryteria podziału na podklasy
EC 1. Oksydoreduktazy	utlenienie i redukcja między dwoma substratami (przenoszenie elektronów i protonów lub bezpośrednie włączanie tlenu do substratu)	rodzaj grupy w donorach ulegającej utlenieniu (–CHOH, aldehydowa, ketonowa itp.)
EC 2. Transferazy	przenoszenie grup funkcyjnych (innych niż wodór) między dwoma substratami	rodzaj grupy przenoszonej (jednowęglowa, glikozylowa, azotowa)
EC 3. Hydrolazy	hydroliza	typ wiązania ulegającego hydrolizie (peptydowe, estrowe, glikozydowe)
EC 4. Liazy	niehydrolityczne rozrywanie wiązań pojedynczych	typ rozrywanego wiązania (C–C, C–O, C–N, C–S)
EC 5. Izomerazy	przekształcenia w obrębie tej samej cząsteczki (wewnątrzcząsteczkowe, racemizacja, izomeryzacja, utlenianie i redukcja, przenoszenie grup itp.)	typ izomeryzacji
EC 6. Ligazy (syntetazy)	łączenie dwóch związków sprzężone z rozerwaniem wiązania pirofosforanowego w ATP lub innych nukleotydach wysokoenergetycznych	typ utworzonego wiązania (C–C, C–O, C–N, C–S)

W podanym powyżej przykładzie posłużono się nazwą zwyczajową enzymu. Nazwa systematyczna α -amylazy to 1,4-glukanohydrolaza: α -1,4-glukan. Nazwy systematyczne enzymów składają się z dwóch części: pierwsza, zakończona na „-aza”, wskazuje na typ katalizowanej reakcji; druga jest nazwą substratu lub substratów. Dodatkowe informacje, niezbędne do wyjaśnienia mechanizmu reakcji, podawane są w nawiasie po nazwie systematycznej enzymu.

Komisja Enzymowa dopuszcza stosowanie nazw potocznych enzymów, zwłaszcza w odniesieniu do enzymów dawno odkrytych np. α -amylazy, trypsyny, chymotrypsyny itp. Często używa się także dwuczłonowych, zwyczajowych nazw enzymów np. oksydaza mleczanowa (EC 1.1.3.2 – oksydoreduktaza L-mleczan : tlen). Są one utworzone wg schematu, w którym pierwsza część nazwy pochodzi od rodzaju katalizowanej reakcji i zawsze ma końcówkę „-aza”, natomiast druga część jest tworzona od nazwy substratu, podanej w formie przymiotnika (końcówka „-owa”).

W praktyce laboratoryjnej można zetknąć się również z nazwami zwyczajowymi enzymów, które zostały utworzone od nazw ich substratów przez dodanie przyrostka „-aza” np. rybonukleaza, ureaza, arginaza. Obecnie nie tworzy się nazw enzymów od nazwy substratu.

Na ogół używanie potocznych nazw enzymów jest wygodniejsze i powszechnie stosowane w literaturze podręcznikowej, natomiast w pracach naukowych podaje się nazwy systematyczne i numery klasyfikacyjne.

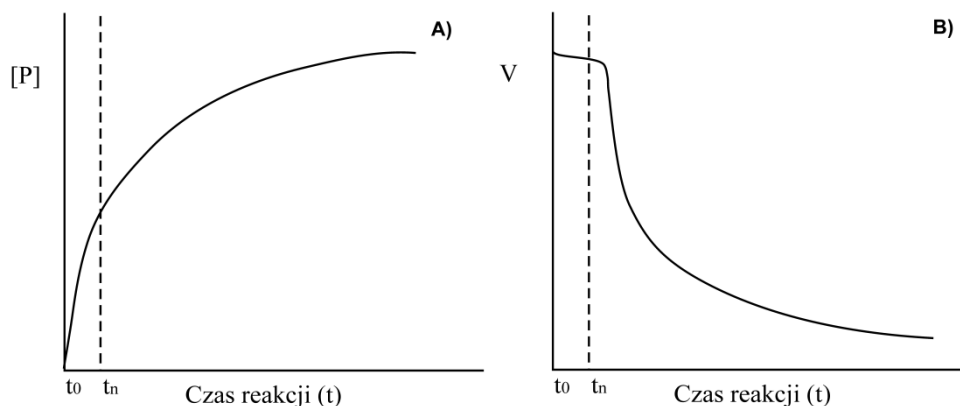
4.2. SZYBKOŚĆ REAKCJI ENZYMATYCZNEJ

Miarą aktywności enzymu jest szybkość katalizowanej reakcji, mierzona przyrostem produktu lub ubytkiem substratu w czasie.

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

[S] – stężenie substratu, [P] – stężenie produktu

W czasie trwania reakcji enzymatycznej, przy stałym stężeniu enzymu i przy określonym początkowym stężeniu substratu, możemy wyróżnić kilka etapów (Rys. 4.5).



Rys.4.5. Zależność stężenia produktu (A) i szybkości reakcji enzymatycznej (B) od czasu jej trwania

Początkowo, przez krótki okres: w czasie od t₀ do t_n, przyrost produktów reakcji enzymatycznej jest wprost proporcjonalny do czasu jej trwania (Rys. 4.5 A) i obserwujemy stałą szybkość reakcji tzw. **szybkość początkową** – v₀. Oznacza to, że w równych odstępach czasu enzym katalizuje powstawanie takiej samej ilości produktu (Rys. 4.5 B). W czasie dłuższego trwania reakcji enzymatycznej szybkość reakcji maleje, ponieważ ilość powstającego produktu przestaje być wprost proporcjonalna do czasu. Przyczyną zmniejszania się przyrostu ilości produktu i tym samym szybkości reakcji enzymatycznej w miarę jej trwania (Rys. 4.5 B) jest wyczerpywanie się substratów, a także w niektórych przypadkach hamowanie aktywności enzymu przez produkty reakcji, reakcje przebiegające w przeciwnym kierunku lub postępująca inaktywacja enzymu w czasie procesu katalizy. W związku z tym, w badaniach enzymologicznych należy bezwzględnie zadbać o to, żeby

warunki reakcji i czas jej trwania były tak dobrane, aby reakcja przebiegała ze stałą szybkością.

4.3. SPOSOBY OKREŚLANIA AKTYWNOŚCI ENZYMU

Pomiar szybkości katalizowanej reakcji umożliwia określenie aktywności enzymu. Aby ułatwić porównywanie aktywności preparatów enzymatycznych, Komisja Enzymowa Międzynarodowej Unii Biochemicznej wprowadziła pojęcie międzynarodowej **standardowej jednostki „U”** (ang. U = unit); w języku polskim określanej jako „J”. Jest to taka ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 μmola substratu lub określonej jego części, tj. 1 μmola odpowiednich grup chemicznych (np. w białkach lub polisacharydach), w ciągu 1 minuty, w temp. 30°C i w optymalnych warunkach (zwłaszcza pH i stężenia substratu zapewniającego wysycenie enzymu). Mianem jednostki standardowej jest $\mu\text{mol/min}$.

Poza jednostką standardową (J) do wyrażania aktywności enzymu stosuje się również jednostkę o nazwie **katal (kat)**. Jest to taka ilość enzymu, która katalizuje przemianę 1 mola substratu w ciągu 1 sekundy. Mianem katala jest mol/s . Jest to jednostka 60 milionów razy większa od jednostki standardowej, stąd też zaleca się stosowanie jednostek pokrewnych:

- mikrokatal ($\mu\text{kat} = 10^{-6} \text{ kat}$),
- nanokatal ($\text{nkat} = 10^{-9} \text{ kat}$),
- pikokatal ($\text{pkat} = 10^{-12} \text{ kat}$).

Zależność liczbowa pomiędzy jednostką standardową i kataliem przedstawia się następująco:

$$1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s} = 60 \text{ moli/min} = 60 \times 10^6 \mu\text{mola/min} = 6 \times 10^7 \text{ J}$$

$$1 \text{ J} = 1 \mu\text{mol/min} = 1/60 \mu\text{mola/s} = 1/60 \mu\text{kat} = 16,67 \times 10^{-9} \text{ kat} = 16,67 \text{ nkat}$$

W metodach oznaczania aktywności różnych enzymów często stosuje się jednostki umowne definiowane np. jako przyrost absorpcji o ustaloną wartość, mierzonej przy określonej długości fali w warunkach danej metody (jednostki umowne są stosowane np. w metodzie Anfinsena oznaczania aktywności RNAzy lub w metodzie Bernfelda oznaczania aktywności α -amylazy (patrz rozdziały 4.9.2 i 4.8.1).

Inną wielkością określającą zdolność enzymu do katalizowania reakcji chemicznych jest stała katalityczna k_{kat} , określająca stosunek szybkości maksymalnej reakcji V_{max} do całkowitego stężenia enzymu:

$$k_{\text{kat}} = V_{\text{max}}/[E] = \mu\text{M/s}/\mu\text{M} = 1/\text{s}$$

Stała katalityczna (liczba obrotów) określa liczbę cząsteczek substratu przetworzonych przez cząsteczkę enzymu w czasie 1 sekundy, w warunkach, w których enzym wykazuje maksymalną aktywność.

Ważną wartością liczbową charakteryzującą czysty enzym, a także preparaty enzymatyczne uzyskiwane w trakcie izolacji enzymów, jest **aktywność właściwa** będąca liczbą jednostek standardowych (lub jednostek umownych) przypadających na 1 mg białka (J/mg białka). Oczyszczanie enzymów, polegające na sukcesywnym stosowaniu różnorodnych technik frakcjonujących, najczęściej chromatograficznych, ma za zadanie otrzymanie enzymu w stopniu możliwie jak najczystszy przez usunięcie z wyjściowego preparatu innych zanieczyszczeń białkowych. Stosując prawidłowy tok postępowania, w czasie oczyszczania enzymu uzyskuje się stały wzrost aktywności właściwej. **Stopień oczyszczenia** każdego preparatu uzyskanego w czasie izolacji enzymu określa się podając stosunek aktywności właściwej w aktualnym roztworze enzymu do aktywności właściwej w materiale wyjściowym.

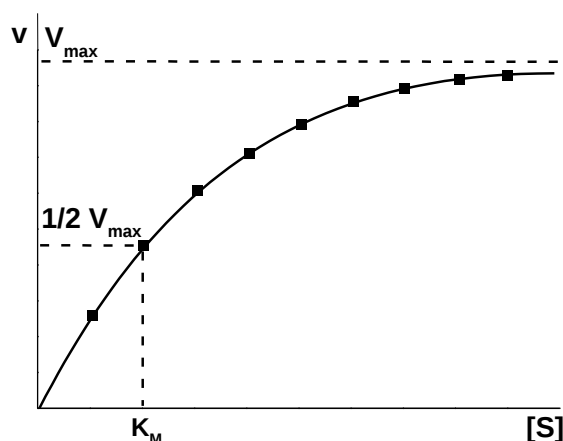
4.4. CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA SZYBKOŚĆ REAKCJI ENZYMATYCZNEJ

Szybkość reakcji enzymatycznych zależy od stężenia substratu i enzymu oraz warunków, w jakich jest przeprowadzana (temperatura, pH, obecność aktywatorów, lub inhibitorów). W czasie badania wpływu danego czynnika na szybkość reakcji enzymatycznej, należy zadbać o to, żeby obserwowane zmiany szybkości reakcji wynikały jedynie ze zmiany wybranego czynnika, dlatego pozostałe powinny być niezmiennie i optymalne dla danego enzymu.

Oznaczenie aktywności enzymu powinno być oparte na pomiarze początkowej szybkości reakcji – v_0 (rozdział 4.2). Należy podkreślić, że pomiar ilości produktu w dowolnym czasie trwania reakcji, bez sprawdzenia, że reakcja przebiega ze stałą szybkością, prowadzi do licznych błędów w oznaczaniu poziomu aktywności.

4.4.1. Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji enzymatycznej

Jednym z ważniejszych czynników, od którego zależy szybkość reakcji enzymatycznej jest stężenie substratu. Zależność ta ma charakter hiperboli: początkowo, wraz ze wzrostem stężenia substratu szybkość reakcji rośnie, a następnie osiąga stałą wartość (Rys. 4.6).



Rys. 4.6. Wykres zależności szybkości reakcji od stężenia substratu

Michaelis i Menten wykazali, że przyczyną obserwowanych zmian szybkości reakcji jest fakt powstawania w czasie reakcji enzymatycznej kompleksu enzym-substrat (ES).



[E] – stężenie enzymu, [S] – stężenie substratu, [ES] – stężenie kompleksu enzym-substrat, [P] – stężenie produktu reakcji, k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} – stałe szybkości odpowiednich reakcji.

W uproszczonym schemacie przebiegu reakcji enzymatycznej możemy wyróżnić kilka etapów: najpierw substrat łączy się z enzymem, w wyniku czego powstaje kompleks ES, który następnie dysocjuje do produktu i enzymu, mogącego ponownie związać się z substratem.

Szybkość reakcji zależy od stężenia kompleksu [ES] oraz szybkości jego tworzenia i rozkładu. Przy niskich stężeniach substratu nie wszystkie cząsteczki enzymu są nim wysyczone. Zwiększanie stężenia substratu powoduje wzrost szybkości reakcji. Początkowo jest to wzrost wprost proporcjonalny do stężenia substratu. Dalsze zwiększanie stężenia substratu powoduje wzrost szybkości reakcji, ale nie jest to zależność liniowa. W końcu przy pewnym stężeniu substratu uzyskujemy szybkość maksymalną reakcji (V_{max}) i dalsze zwiększanie stężenia substratu nie powoduje wzrostu szybkości reakcji. Dzieje się tak dlatego, że wszystkie cząsteczki enzymu w danej chwili znajdują się w kompleksie z substratem i tym samym enzym wykazuje swoją maksymalną aktywność katalityczną.

Stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej osiąga połowę wartości szybkości maksymalnej ($1/2 V_{\max}$) nazywa się stałą Michaelisa (K_M).

Stała Michaelisa ma wymiar stężenia molowego (mol/l). Jej wielkość jest niezależna od stężenia enzymu, zależy natomiast od rodzaju substratu, pH i temperatury. W przypadku enzymów, które działają na kilka substratów, każdemu substratowi odpowiada charakterystyczna wartość K_M . Wartości stałych Michaelisa mieszczą się w granicach od 10^{-3} do 10^{-6} mola/litr i są miarą powinowactwa enzymu do substratu. Im niższa wartość K_M , tym powinowactwo enzymu do danego substratu jest wyższe.

Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu opisuje równanie Michaelisa-Menten:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + (K_M/[S])}$$

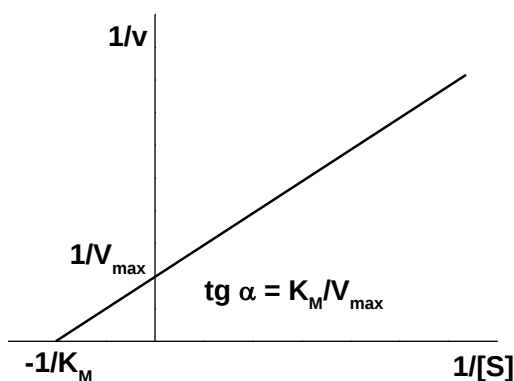
Można je zapisać również w formie równania hiperboli:

$$(V_{\max} - v)(K_M + [S]) = V_{\max} K_M$$

Stałą Michaelisa dla danego substratu można wyznaczyć eksperymentalnie, mierząc początkowe szybkości reakcji przy wzrastających stężeniach substratu (rozdział 4.6.1 i 4.7.4.3). Graficzne wyznaczenie K_M z wykresu zależności szybkości reakcji od stężenia substratu (Rys. 4.6), może być trudne, ponieważ nie ma pewności, czy szybkość maksymalna reakcji ($V_{\max}$) została osiągnięta. Z tego powodu podstawowe równanie Michaelisa-Menten przekształca się w taki sposób, aby uzyskać równanie prostej. Najczęściej stosowane przekształcenie to równanie Lineweavera-Burka:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

W metodzie Lineweavera-Burka wykreśla się zależność $1/v$ od $1/[S]$, dzięki czemu uzyskuje się prostą o nachyleniu ($\tan \alpha$) równym $K_M/V_{\max}$. W punkcie przecięcia prostej z osią rzędnych (0Y) można odczytać wartość $1/V_{\max}$, natomiast w punkcie przecięcia z osią odciętych (0X) wartość $-1/K_M$ (Rys. 4.7).



Rys. 4.7. Wyznaczanie K_M i $V_{\max}$ metodą Lineweavera-Burka

Do wyznaczania w sposób graficzny wartości K_M i $V_{\max}$ służą także inne metody, oparte na przekształceniach podstawowego równania Michaelisa-Menten do postaci funkcji liniowej.

Równanie Hanesa-Woolfa otrzymuje się w wyniku dalszej modyfikacji równania Lineweavera-Burka, po pomnożeniu obu stron równania przez $[S]$:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V} [S] + \frac{K_M}{V}$$

W otrzymanym równaniu prostej $y = ax + b$, $y = [S]/v$, $a = 1/V_{\max}$, $x = [S]$ i $b = K_M/V_{\max}$. Wykresem równania jest prosta przecinająca oś OY w punkcie $K_M/V_{\max}$, a oś OX – w punkcie $-K_M$.

Równanie Woolf-Augustinsson-Hofstee o postaci:

$$v = -K_M \frac{v}{[S]} + V_{\max}$$

jest przekształceniem równania Michaelisa-Menten. W równaniu tym o ogólnej postaci $y = ax + b$, $y = v$, $a = -K_M$, $x = v/[S]$, i $b = V_{\max}$.

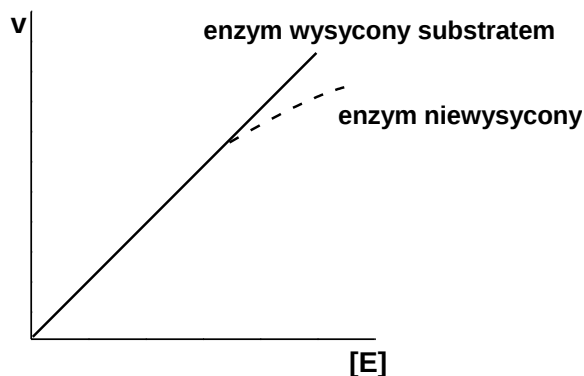
Punkt przecięcia prostej z osią OY wyznacza wartość $V_{\max}$, a miejsce przecięcia z osią OX wyznacza stosunek $V_{\max}/K_M$.

Wyznaczanie wartości K_M i $V_{\max}$ metodą Hanesa-Woolfa lub Woolf-Augustinsson-Hofstee stosuje się często przy określaniu typu inhibicji (patrz rozdział 4.4.5.1). Tam też przedstawione są wykresy ilustrujące obie powyższe metody (Rys. 4.12 C, D i Rys. 4.13 C, D).

4.4.2. Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji enzymatycznej

Szybkość reakcji enzymatycznej rośnie wprost proporcjonalnie do stężenia enzymu, pod warunkiem że pomiar będzie prowadzony w warunkach wysycenia enzymu substratem i przy niezmiennych pozostałych parametrach reakcji (pH, temperatura).

Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia enzymu przedstawia Rys. 4.8. Przy stężeniu substratu zapewniającym wysycenie enzymu szybkość reakcji jest wprost proporcjonalna do stężenia enzymu. Przy niewystarczającym stężeniu substratu szybkość reakcji maleje.



Rys. 4.8. Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji enzymatycznej

4.4.3. Wpływ temperatury na szybkość reakcji enzymatycznej

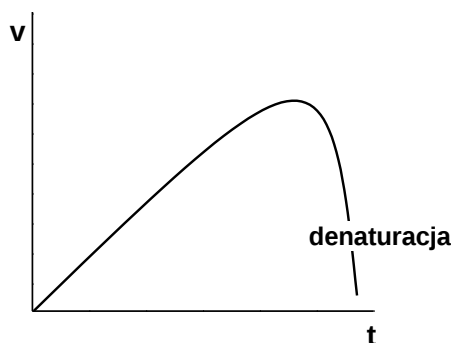
Szybkość reakcji chemicznych wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, co jest następstwem podwyższenia energii kinetycznej reagujących ze sobą cząsteczek. Wielkość tego wzrostu opisuje **współczynnik temperaturowy** Q_{10} , określający jak zmienia się szybkość reakcji (v) przy wzroście temperatury o 10°C .

$$Q_{10} = \frac{v_{(t+10^{\circ}\text{C})}}{v_t}$$

Wpływ temperatury na szybkość reakcji enzymatycznych nie jest prostą zależnością, gdyż pozostaje w ścisłym związku z białkową naturą enzymów. Tak więc szybkość reakcji enzymatycznej, podobnie jak szybkość każdej reakcji chemicznej, zwiększa się ze wzrostem temperatury, jednakże tylko w takim jej zakresie, w którym enzym jest stabilny i zachowuje pełną aktywność.

Szybkość reakcji enzymatycznych wzrasta przeciętnie dwukrotnie przy każdym wzroście temperatury o 10°C w zakresie temperatur nie powodujących denaturacji danego enzymu ($Q_{10} = 2$). Współczynnik temperaturowy Q_{10} jest charakterystyczny dla danego enzymu i zależy od energii aktywacji katalizowanej reakcji.

Typową zależność szybkości reakcji enzymatycznej od temperatury przedstawiono na Rys. 4.9. Wraz ze wzrostem temperatury szybkość reakcji enzymatycznej początkowo wzrasta, osiąga wartość maksymalną, a następnie maleje, wskutek denaturacji enzymu powodującej jego dezaktywację.



Rys.4.9. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od temperatury

Temperaturę, przy której szybkość reakcji enzymatycznej jest najwyższa, nazywamy temperaturą optymalną. Istnienie takiego optimum uwarunkowane jest faktem, że enzymy będąc białkami, ulegają denaturacji cieplnej. Obserwowana temperatura optymalna reakcji enzymatycznej jest wypadkową dwóch procesów:

- wzrostu szybkości reakcji wskutek wzrostu energii kinetycznej reagentów oraz
- wzrostu szybkości denaturacji termicznej enzymu powyżej pewnej krytycznej wartości temperatury.

Większość enzymów wykazuje optimum temperatury w zakresie $35\text{--}45^{\circ}\text{C}$, a w temperaturach powyżej 60°C traci aktywność nieodwracalnie. Istnieją jednak enzymy, które zachowują aktywność nawet po dłuższym ogrzewaniu w temp. 100°C (np. enzymy wydzielane przez bakterie żyjące w gorących źródłach).

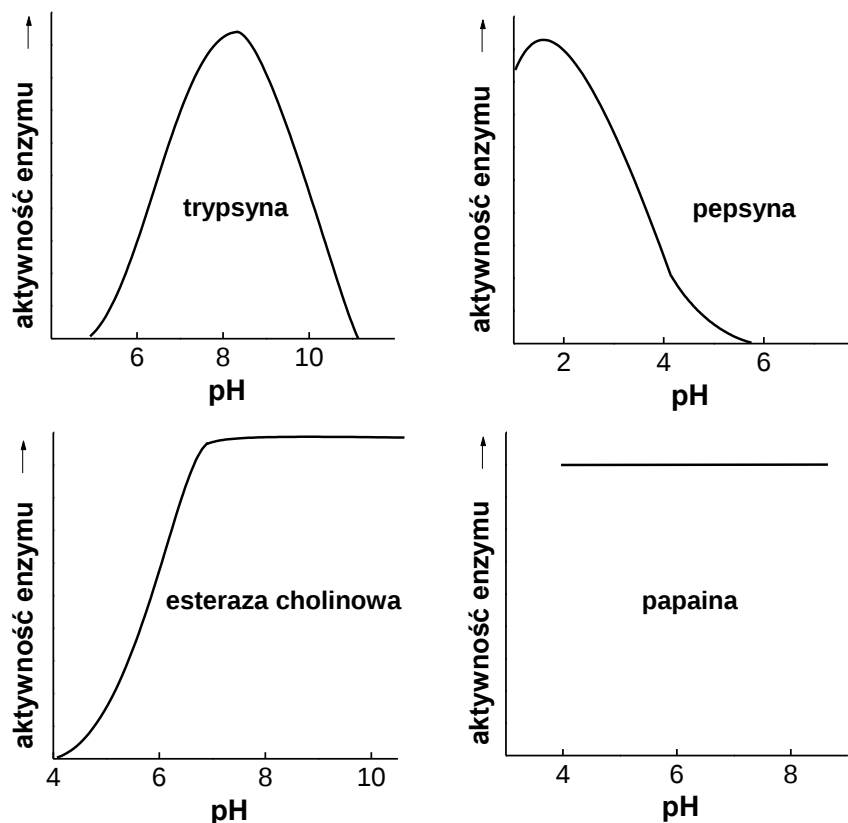
W przypadku wielu enzymów dłuższa inkubacja w temperaturze optymalnej może powodować utratę ich aktywności, dlatego często testy enzymatyczne przeprowadza się w temperaturach niższych niż optymalna.

Wartość temperatury optymalnej danego enzymu zależy od stopnia jego oczyszczenia, pH, obecności soli, aktywatorów, lub inhibitorów. Czynniki te mogą wpływać na tzw. termostabilność enzymu, określającą najwyższą temperaturę, w której jeszcze nie dochodzi do termicznej inaktywacji enzymu w danych warunkach (pH, czas inkubacji, obecność substratu).

4.4.4. Wpływ pH na szybkość reakcji enzymatycznej

Większość enzymów wykazuje maksymalną aktywność w środowisku o określonym pH. **Optimum pH** jest bardzo ważną wartością liczbową charakteryzującą enzym. Enzymy jako białka posiadają grupy zdolne do jonizacji, stąd też zmiany aktywności enzymatycznej przy różnych pH mogą być wywołane zmianami w stopniu zjonizowania enzymu, kompleksu ES, a także samego substratu. Aminokwasy centrum aktywnego enzymu biorące bezpośredni udział w akcie katalizy bardzo często tylko w jednej z form jonowych wykazują właściwości katalityczne. Od stopnia zjonizowania pewnych grup w cząsteczce enzymu zależy może jego konformacja i w danym pH może być ona najkorzystniejsza dla jego właściwości

katalitycznych. Ponadto oddziaływania pomiędzy enzymem i substratem prowadzące do wytworzenia kompleksu ES mogą mieć także charakter jonowy. Wreszcie zbyt kwaśne lub zasadowe środowisko może spowodować denaturację enzymu.



Rys.4.10. Wpływ pH na aktywność różnych enzymów

Optymalną wartość pH wyznacza się z wykresu zależności szybkości reakcji od pH środowiska reakcji. Krzywa ta najczęściej ma kształt dzwonowy (jak w przypadku trypsyny, Rys. 4.10), tzn. enzym wykazuje najwyższą aktywność w pH optymalnym, natomiast poniżej i powyżej tej wartości aktywność enzymu maleje. Większość enzymów wykazuje optimum pH w zakresie 6–8.

Nie zawsze jednak krzywa zależności aktywności od pH musi mieć charakter dzwonowy. Niektóre enzymy mają taką samą aktywność w szerokim zakresie pH, np. papaina, esteraza cholinowa (Rys. 4.10).

Pomiar optimum pH przeprowadza się w stałej temperaturze, w warunkach nasycenia enzymu substratem i w buforach o odpowiednio dobranej pojemności, tak aby powstające produkty reakcji nie zmieniały ich pH. Należy również zwrócić uwagę, aby rodzaj stosowanego buforu nie wywierał wpływu na aktywność enzymu.

4.4.5. Wpływ inhibitorów enzymów na szybkość reakcji enzymatycznej

Wyróżnia się zasadniczo dwa typy inhibicji enzymów: odwracalny i nieodwracalny. **Inhibitory nieodwracalne** wiążą się kowalencyjnie z enzymem (nie zawsze w obrębie centrum aktywnego), powodując trwałą utratę aktywności katalitycznej.

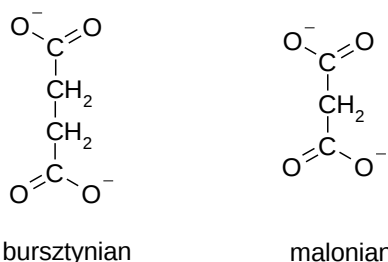
Przykłady inhibitorów nieodwracalnych to:

- diizopropylodifluorofosforan (DIFP), łączący się kowalencyjnie z resztą seryny w centrum aktywnym enzymu, np. acetylocholinesterazy, przez co powoduje paraliż układu nerwowego
- amid kwasu jodooctowego, alkilujący reszty cysteiny niezbędne do aktywności pewnych enzymów

Inhibitory odwracalne stanowią zróżnicowaną grupę cząsteczek zarówno pod względem budowy jak i kinetyki oddziaływania z enzymem. Ich wspólną cechą jest możliwość dysocjacji kompleksu enzym–inhibitor. Można je podzielić na kilka podgrup, z czego poniżej zostaną scharakteryzowane dwie z nich: inhibitory kompetycyjne i niekompetycyjne.

Hamowanie kompetycyjne (konkurencyjne)

Inhibitory kompetycyjne strukturalnie przypominają substrat i współzawodniczą z nim o miejsce aktywne enzymu. Związanie inhibitora z wolnym enzymem uniemożliwia wiązanie cząsteczki substratu i hamuje przebieg reakcji enzymatycznej. Wcześniejsze przyłączenie substratu do enzymu wyklucza możliwość związania inhibitora, tak więc wiązanie substratu i inhibitora konkurencyjnego nawzajem się wykluczają. Obniżenie efektu inhibicji kompetycyjnej można uzyskać zwiększając stężenie substratu.



Rys. 4.11. Wzory strukturalne kwasu bursztynowego i malonowego

Klasycznym przykładem inhibicji kompetycyjnej jest hamowanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (enzym cyklu Krebsa katalizujący przekształcenie bursztynianu do fumaranu) przez kwas malonowy, różniący się od kwasu bursztynowego brakiem jednej grupy metylenowej (Rys. 4.11).

Hamowanie niekompetycyjne (niekonkurencyjne)

Inhibitory niekompetycyjne przyłączają się w cząsteczce enzymu do innego miejsca niż centrum aktywne, dlatego mogą wiązać się z enzymem w sposób niezależny od substratu. Inhibitor może przyłączyć się do wolnego enzymu lub do kompleksu ES. Podobnie substrat może wiązać się z wolnym enzymem, a także z kompleksem EI. Powstający ostatecznie kompleks enzym–substrat–inhibitor (ESI) jest nieaktywny katalitycznie, ponieważ związanie inhibitora uniemożliwia uzyskanie przez centrum aktywne enzymu odpowiedniej konformacji. Z tego powodu nie można cofnąć efektu hamowania przez zwiększenie stężenia substratu.

Przykładem inhibicji niekonkurencyjnej jest odwracalne wiązanie się niektórych odczynników z grupami –SH reszt cysteinowych, istotnymi dla aktywności niektórych enzymów (np. jony Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , tworzące z grupami –SH merkaptidy). Niezbędne do aktywności grupy –SH mogą być zlokalizowane także poza centrum aktywnym enzymu, pomagając w utrzymaniu określonej konformacji cząsteczki. W tym przypadku ich blokowanie prowadzi do niekorzystnych zmian konformacyjnych. Inhibicję niekompetycyjną mogą spowodować również czynniki wiążące się z niezbędnym do aktywności enzymu metalem, np. EDTA (etylenodiaminotetraoctan), wiążący kationy dwuwartościowe, lub cyjanki tworzące nieaktywne kompleksy typu cyjanożelazianów z jonami Fe^{2+} i Fe^{3+} (żelazi- lub żelazocyjanki).

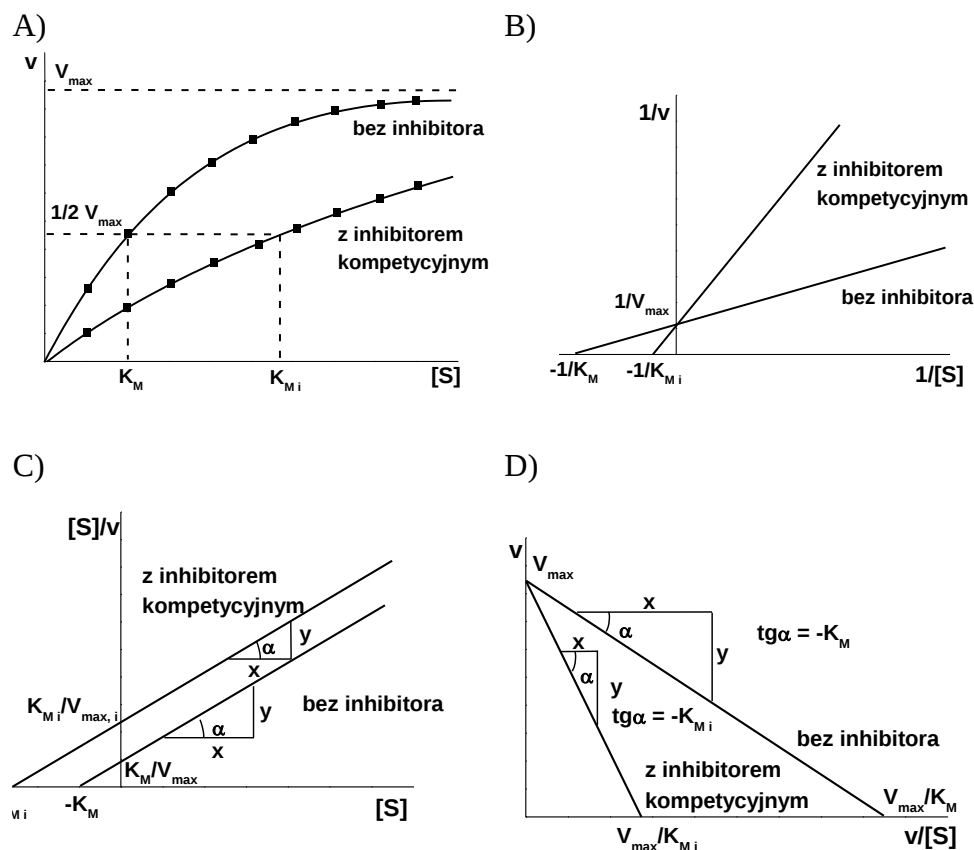
Hamowanie akompetycyjne

Inhibitory akompetycyjne wiążą się odwracalnie tylko do kompleksu enzym-substrat, tworząc nieaktywny kompleks ESI. Związanie inhibitora obniża stężenie kompleksu ES, co pozornie zwiększa powinowactwo enzymu do substratu (przesunięcie równowagi reakcji). Inhibitor akompetycyjny obniża wartość zarówno V_{max} , jak i K_M o tę samą wartość. Jest to rodzaj inhibicji rzadko spotykanej w reakcjach jednosubstratowych.

4.4.5.1. Kinetyczne rozróżnianie inhibicji kompetycyjnej i niekompetycyjnej

Rozróżnienie inhibicji kompetycyjnej od niekompetycyjnej umożliwiają pomiary szybkości reakcji i wyznaczenie stałych Michaelisa w obecności danego inhibitora, a następnie porównanie ich z tymi samymi parametrami wyznaczonymi dla reakcji enzymatycznej przebiegającej bez inhibitora. Graficznie parametry K_M i V_{max} najłatwiej wyznaczyć np. metodą Lineweavera-Burka (rozdział 4.4.1, Rys. 4.7). Innymi często stosowanymi metodami graficznymi są metody Hanesa-Woolfa i Woolf-Augustinsson-Hofstee (patrz rozdział 4.4.1).

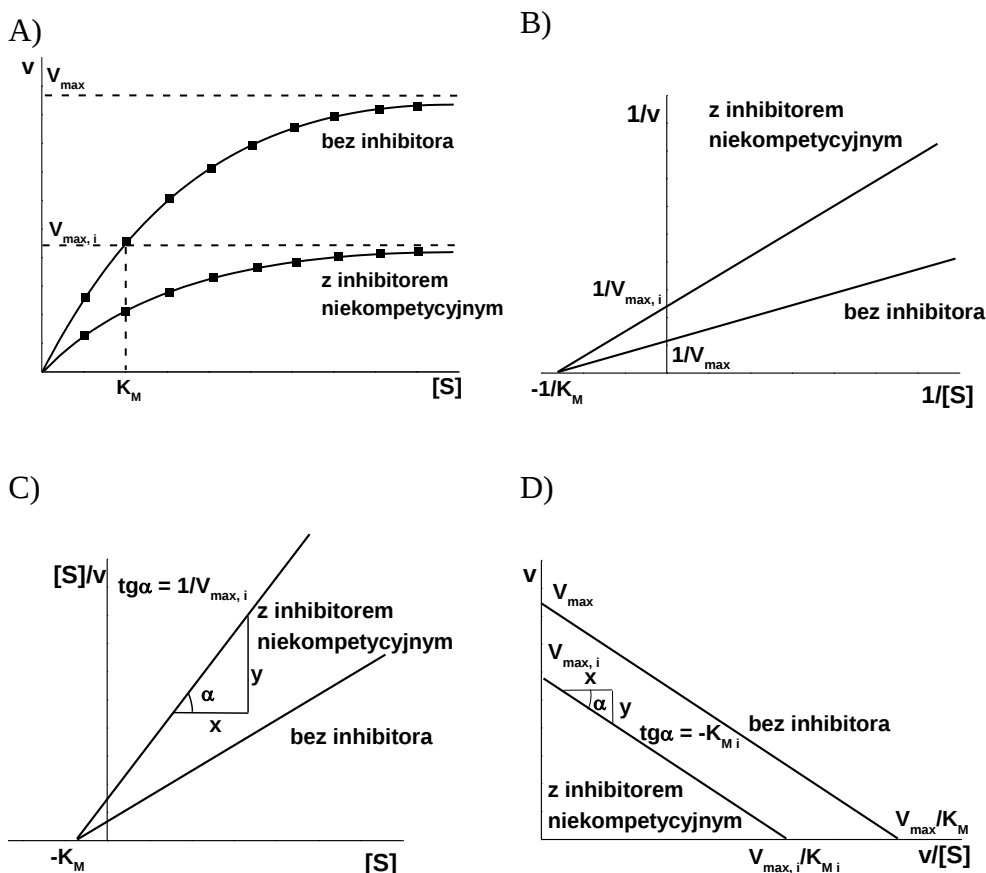
W inhibicji kompetycyjnej obserwujemy wzrost wartości K_M , natomiast wartość V_{max} nie zmienia się; jednak można ją uzyskać przy stężeniu substratu dużo wyższym niż w nieobecności inhibitora (Rys. 4.12).



Rys. 4.12. Wpływ inhibitorów kompetycyjnych na szybkość reakcji enzymatycznej

Wykresy równań: A - Michaelisa-Menten; B - Lineweavera-Burka; C - Hanesa-Woolfa; D - Woolf-Augustinsson-Hofstee.

W inhibicji niekompetycyjnej szybkość maksymalna (V_{max}) ulega zmniejszeniu, ponieważ inhibitor niekompetycyjny zmienia aktywność katalityczną enzymu, nie ulega natomiast zmianie wartość K_M , określająca powinowactwo enzymu do substratu (Rys. 4.13).



Rys. 4.13. Wpływ inhibitorów niekompetycyjnych na szybkość reakcji enzymatycznej

Wykresy równań: A - Michaelisa-Menten; B - Lineweavera-Burka; C - Hanesa-Woolfa; D - Woolf-Augustinsson-Hofstee.

4.4.6. Aktywatory enzymów

Aktywatory enzymów to różnego rodzaju substancje zwiększające ich aktywność, lecz nie biorące bezpośrednio udziału w reakcji katalizy. Są to jony niektórych metali wbudowane w część białkową enzymu lub też związki drobnocząsteczkowe usuwające wpływ związków hamujących.

Aktywatorami są najczęściej jony metali, które mogą uczestniczyć w wiązaniu substratu przez enzym lub są odpowiedzialne za utrzymanie aktywnej katalitycznej konformacji enzymu. Enzymy są najczęściej aktywowane przez kationy: Mg^{2+} (fosfatazy, fosforylasy, syntetazy), Zn^{2+} (dehydrogenaza mleczanowa, dehydrogenaza alkoholowa, proteazy), Mn^{2+} (peptydazy, arginaza), Ca^{2+} (lipaza, kalpainy), Cu^{2+} (oksydazy). Aniony najczęściej nie są czynnikami wpływającymi na aktywność enzymów. Wyjątek stanowią jonany Cl^- , będące aktywatorami amylazy ze śliny. Często rolę swoistych aktywatorów enzymów pełnią tzw. pierwiastki śladowe, będące niezbędnymi składnikami pokarmowymi.

Aktywność niektórych enzymów ulega zahamowaniu pod wpływem łagodnych środków utleniających, np. tlenu atmosferycznego. Proces ten katalizowany jest przez metale ciężkie. Takie zahamowanie aktywności enzymu jest często procesem odwracalnym i aktywność enzymu powraca w obecności czynników redukujących lub wiążących metale. Utlenienie grup $-SH$ enzymu często prowadzi do utraty aktywności; można ją odzyskać przez dodanie czynników redukujących takich jak cysteina, zredukowany glutation czy merkaptotetanol lub DTT.

Aktywatorami dla niektórych enzymów mogą być również inne enzymy. Dotyczy to enzymów wydzielanych w postaci nieaktywnych katalitycznie tzw. proenzymów lub prekursorów enzymów, np. tripsynogen aktywowany jest do tripsyny przy pomocy enterokinazy.

4.5. TRYPSYNA

Enzymy proteolityczne hydrolizują wiązania peptydowe. Podzielono je na dwie grupy: endo- i egzopeptydazy. **Egzopeptydazy** mogą odszczepić z łańcucha białkowego jedynie aminokwasy N- lub C-końcowe, stąd nazywa się je amino- lub karboksypeptydazami. **Endopeptydazy** hydrolizują wiązania peptydowe ułożone wewnątrz łańcucha białkowego i zgodnie z klasyfikacją nazywa się je hydrolazami peptydylopeptydowymi.

Trypsyna (EC 3.4.21.4) jest endopeptydazą serynową (w centrum aktywnym tego enzymu znajduje się seryna) wydzielaną przez trzustkę w postaci nieaktywnego proenzymu – trypsynogenu. Trypsynogen ulega aktywacji w dwunastnicy przy udziale enzymu enterokinazy (enteropeptydazy) bądź trypsyny (autoaktywacja). Proces aktywacji polega na odszczepieniu od trypsynogenu fragmentu sześćoaminokwasowego (heksapeptydu) od strony N-końca proenzymu.

Trypsyna jest enzymem o wysokiej specyficzności, hydrolizuje tylko te wiązania peptydowe, które zostały utworzone przez grupy karboksylowe należące do lizyny lub argininy. W związku z tym wszystkie peptydy powstałe w wyniku działania trypsyny mają lizynę bądź argininę jako aminokwasy C-końcowe. Trypsyna pozostawiona w buforze o pH zbliżonym do optymalnego ulega samostrawieniu (autolizie). Czynnikiem zapobiegającym temu procesowi są jony wapnia (Ca^{2+}), dlatego też aktywność tego enzymu oznacza się w ich obecności. Roztwory enzymu należy przechowywać w niskiej temperaturze, najlepiej w

1 mM HCl (pH = 3), w obecności około 20 mM CaCl_2 .

Aktywność trypsyny oznacza się wobec substratów białkowych (kazeina, żelatyna) lub syntetycznych będących pochodnymi amidowymi lub estrowymi argininy lub lizyny.

4.5.1. Wpływ stężenia trypsyny na szybkość degradacji kazeiny

Kakade M.L., Swenson D.H., Liener I.E. (1970) Anal. Biochem. 33, 255–258.

Zasada metody

Kazeina (główne białko mleka) trawiona trypsyną daje produkty (peptydy o niskiej masie cząsteczkowej) rozpuszczalne w kwasie trichlorooctowym (TCA), które dzięki obecności w nich aminokwasów aromatycznych, głównie tyrozyny i tryptofanu, oznaczają się przez pomiar absorbancji przy 280 nm. Liniową zależność przyrostu produktów degradacji w warunkach metody uzyskuje się dla 2–20 μg trypsyny w próbce i przy końcowym stężeniu kazeiny wynoszącym 0,5%.

Wykonanie krzywej kalibracyjnej

1. Przygotować 6 próbek. Do kolejnych pięciu odmierzyć od 0,1 do 0,5 ml roztworu enzymu o stężeniu 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Próby uzupełnić do 1 ml 1mM HCl zawierającym 80 mM CaCl_2 .
2. Do próbki 6 (próba kontrolna) odmierzyć 1 ml 1mM HCl z 80 mM CaCl_2 .
3. Umieścić w łaźni wodnej lub bloku grzejnym o temp. 37°C wszystkie próby oraz 1% roztwór kazeiny w 0,2 M buforze Tris-HCl o pH 8,0 (około 10 ml).
4. Po 5 minutach preinkubacji (mającej na celu ogrzanie prób enzymu i roztworu substratu do temp. 37°C) rozpocząć reakcję enzymatyczną przez dodanie 1 ml kazeiny do próbek zawierających 4–20 μg trypsyny.
5. Dokładnie po 10 minutach reakcję przerwać przez dodanie 3 ml kwasu trichlorooctowego. Próby dokładnie wymieszać. Kazeina niestrawiona przez enzym wytrąca się w postaci osadu, natomiast niskocząsteczkowe produkty degradacji (peptydy) rozpuszczają się w TCA.
6. Po 15 minutach w temp. pokojowej próby odwirować.
7. W płynach nad osadu (supernatantach) zmierzyć A_{280} wobec wody.
8. Wartość absorbancji uzyskaną dla próby kontrolnej odjąć od wartości A_{280} uzyskanych dla prób właściwych. Wykreślić zależność A_{280} od ilości μg enzymu w próbce.

Zadanie indywidualne

1. W próbie uzyskanej od asystenta oznaczyć aktywność trypsyny zgodnie z postępowaniem opisanym powyżej.
2. Z krzywej kalibracyjnej odczytać ilość enzymu w próbie.
3. Podać stężenie trypsyny w próbie indywidualnej (μg enzymu/ ml roztworu).

Materiały i odczynniki

- roztwór enzymu: około 2 mg trypsyny rozpuścić w 5 ml 1 mM HCl z 80 mM CaCl_2 ; zmierzyć absorbancję roztworu przy 280 nm i uzyskaną wartość pomnożyć przez 0,67 – wagowy współczynnik absorpcji dla trypsyny (odwrotność właściwego współczynnika absorpcji), uzyskując ilość mg trypsyny w 1 ml; roztwór enzymu rozcieńczyć 1 mM HCl z 80 mM CaCl_2 tak, aby zawierał 40 $\mu\text{g/ml}$
- 1% roztwór substratu: 1 g kazeiny zawiesić w 100 ml 0,2 M buforu Tris-HCl o pH 8,0 i gotować na wrzącej łaźni przez 15 minut; po ostygnięciu uzupełnić wodą do 100 ml
- roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA): 18 g TCA, 18 g bezwodnego octanu sodu i 20 ml lodowatego kwasu octowego uzupełnić wodą do 1 000 ml
- 0,2 M bufor Tris/HCl o pH 8,0
- 1 mM HCl zawierający 80 mM CaCl_2

4.5.2. Wykazywanie aktywności trypsyny wobec kazeiny i wpływ inhibitora na jej aktywność

Kakade M.L., Swenson D.H., Liener I.E. (1970) Anal. Biochem. 33, 255–258.

Zasadę metody opisano szczegółowo w rozdziale 4.5.1.

Postępowanie

1. Do 6 próbek odpipetować następujące objętości roztworu enzymu, 0,2 M buforu Tris/HCl o pH 8,0 i inhibitora:

nr próby	bufor [ml]	enzym [ml]	inhibitor [ml]
kontrola	1,00	–	–
1	0,90	0,10	–
2	0,75	0,25	–
3	0,50	0,50	–
4	0,45	0,50	0,05
5	0,40	0,50	0,10

2. Wstawić próbki do bloku grzejnego lub łaźni wodnej o temp. 37°C i po 5-10 minutach preinkubacji dodać w odstępach 30 sekundowych do każdej próbki po 1 ml 1% kazeiny, ogrzanej do temp. 37°C.
3. Dokładnie po 10 minutach reakcję przerwać przez dodanie do każdej próby 3 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (również w odstępach 30 sekund, zachowując tę samą kolejność pipetowania); próby należy dokładnie wymieszać.
4. Wyjąć próbki z bloku/łaźni i po 15 minutach odwirować osad niestrawionej kazeiny.
5. Odczytać A_{280} w supernatantach wobec wody.
6. Od uzyskanych wyników odjąć wartość absorbancji uzyskaną dla próby kontrolnej.

Opracowanie wyników

- Przedstawić, w formie tabeli, skład poszczególnych prób badanych (stężenia enzymu i inhibitora, przy których wykonywano oznaczenia) oraz uzyskane wyniki.
- Obliczyć % zahamowanej aktywności enzymatycznej w próbach 4 i 5 względem próby nr 3.

Materiały i odczynniki

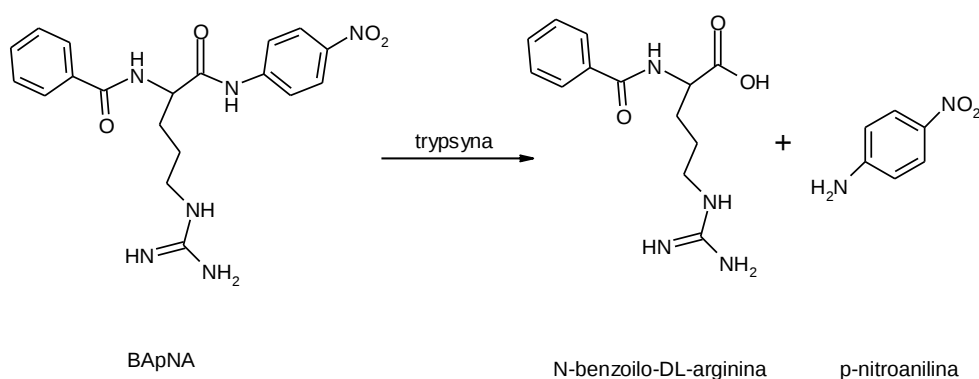
- roztwór inhibitora trypsyny (z nasion soi) o stężeniu 1 mg/ml
- roztwór trypsyny o stężeniu 80 µg/ml (por. rozdział 4.5.4)
- pozostałe odczynniki jak w ćw. 0

4.5.3. Oznaczanie aktywności trypsyny wobec p-nitroanilidu N-benzoilo-DL-argininy (BApNA)

Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 95, 271–278.

Zasada metody

Trypsyna hydrolizuje p-nitroanilid N-benzoilo-DL-argininy (BApNA) z wydzieleniem p-nitroaniliny o zabarwieniu żółtym i absorpcji przy 410 nm ($\epsilon_{410} = 8\,800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Rys. 4.14).



Rys. 4.14. Reakcja hydrolizy p-nitroanilidu N-benzoilo-DL-argininy (BApNA) katalizowana przez trypsynę

Wykonanie krzywej kalibracyjnej

1. Do pięciu probówek odmierzyć kolejno 20, 40, 60, 80 i 100 µl roztworu trypsyny o stężeniu 100 µg/ml.
2. Próby uzupełnić do objętości 1,0 ml 0,1 M buforem Tris-HCl o pH 8,0 z 0,02 M CaCl₂; Przygotować próbę ślepą zawierającą 1 ml buforu.
3. Wszystkie próby wstawić do bloku grzejnego lub łaźni wodnej o temp. 25°C i preinkubować 5 minut.
4. Po tym czasie rozpocząć reakcję, dodając do każdej z prób 10 µl 0,1 M BApNA. Dokładnie wymieszać.
5. Po 10 minutach przerwać reakcję enzymatyczną przez dodanie 0,5 ml 30% kwasu octowego. Odczytać A₄₁₀ prób badanych wobec próby ślepej.
6. Wykreślić zależność A₄₁₀ od ilości µg enzymu w próbce.

Zadanie indywidualne

1. W próbce uzyskanej od asystenta oznaczyć aktywność trypsyny zgodnie z postępowaniem opisanym powyżej.
2. Z krzywej kalibracyjnej odczytać ilość enzymu w próbce.
3. Podać stężenie trypsyny w próbce indywidualnej (µg enzymu / ml roztworu).

Materiały i odczynniki

- bufor reakcyjny: 0,1 M Tris-HCl o pH 8,0 z 20 mM CaCl₂
- roztwór substratu: 0,1 M BApNA w dimetylosulfotlenku (DMSO); można przechowywać w zamrażalniku
- roztwór enzymu: około 1 mg trypsyny bydlęcej rozpuścić w 1 ml 1 mM HCl z 20 mM CaCl₂; zmierzyć A₂₈₀ i obliczyć rzeczywiste stężenie trypsyny (patrz rozdział 0); roztwór trypsyny rozcieńczyć tak, aby zawierał 100 µg enzymu w 1 ml
- odczynnik przerywający reakcję: 30% kwas octowy

Uwaga! Aby móc oznaczyć rzeczywistą ilość aktywnej trypsyny w próbie posługując się krzywą kalibracyjną, do jej sporządzenia należy wykorzystać roztwór o dokładnie znanym stężeniu aktywnego enzymu. W przypadku enzymów oznaczenie jedynie stężenia białka jest niewystarczające, ponieważ część enzymu może być nieaktywna. Stężenie aktywnej trypsyny można oznaczyć poprzez zmiareczkowanie centrów aktywnych enzymu za pomocą NPGB (p-nitrofenylo-4-guanidynobenzoesan) – rozdział 4.6.1 B.

4.5.4. Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji katalizowanej przez trypsynę

Zasadę metody opisano szczegółowo w rozdziale 4.5.3.

Przygotowanie wyjściowego roztworu trypsyny (stock solution)

Wyjściowy roztwór trypsyny jest przygotowywany jednocześnie dla wszystkich zespołów.

1. Odważyć odpowiednią ilość trypsyny (ok. 0,8mg/zespół) i rozpuścić w 1mM HCl z 20mM CaCl₂ (2,5ml/mg).
2. Zmierzyć absorbancję roztworu przy 280nm i uzyskaną wartość pomnożyć przez 0,67 (wagowy współczynnik absorpcji dla trypsyny – odwrotność współczynnika właściwego), uzyskując stężenie trypsyny w mg/ml.
3. Roztwór podzielić na porcje, w zależności od liczby zespołów.

Przygotowanie roboczego roztworu trypsyny (working solution)

Roboczy roztwór trypsyny jest przygotowywany przez każdy zespół indywidualnie.

1. Wyjściowy roztwór enzymu rozcieńczyć 1mM HCl z 20mM CaCl₂ do końcowego stężenia 80µg/ml i objętości 6ml.
2. Pozostały wyjściowy roztwór (*stock solution*) trypsyny zachować (por. rozdział 4.5.6).

Postępowanie

1. Do dwóch serii po 5 probówek (próby badane i kontrolne) odmierzyć podane w poniższej tabeli objętości buforu do reakcji oraz roztworu enzymu (*working solution*) (seria prób badanych) lub 1mM HCl z 20mM CaCl₂ (seria prób kontrolnych):

nr próby	bufor [µl]	trypsyna 80µg/ml [µl] <u>lub</u> 1mM HCl z 20mM CaCl ₂
1	965	20
2	945	40
3	925	60
4	905	80
5	885	100

2. Reakcję enzymatyczną rozpocząć przez dodanie 15µl 0,1M roztworu BApNA, dokładnie wymieszać.
3. Reakcję prowadzić w temperaturze pokojowej.
4. **Po dokładnie 10 minutach** reakcję enzymatyczną przerwać przez dodanie 0,5ml 30% kwasu octowego, dokładnie wymieszać. Kwas octowy dodać również do prób kontrolnych.
5. Odczytać A_{410} poszczególnych prób wobec próby odczynnikowej („ślepej”) (1ml buforu do reakcji i 0,5ml kw. octowego).
6. Od wyników uzyskanych dla prób badanych odjąć wartości uzyskane dla odpowiadających im prób kontrolnych.

Opracowanie wyników:

1. Opisać niezmiennie warunki prowadzonych reakcji.
2. Obliczyć szybkość reakcji (ilość µmol pNA zwolnionej w ciągu 1 minuty reakcji) w każdej z badanych prób).
3. Przedstawić, w formie tabeli, skład poszczególnych prób badanych (stężenia enzymu, przy których wykonano oznaczenia) oraz uzyskane wyniki.
4. Wykreślić zależność szybkości reakcji od stężenia enzymu [µg/ml] w mieszaninie reakcyjnej.

Materiały i odczynniki

- trypsyna
- bufor 0,1M Tris/HCl, pH 8,0 z 20mM CaCl₂
- 0,1M roztwór substratu BApNA w dimetylosulfotlenku (DMSO)
- 1mM HCl z 20mM CaCl₂
- 30% roztwór kwasu octowego

4.5.5. Wpływ stężenia BApNA na szybkość reakcji katalizowanej przez trypsynę

Zasadę metody opisano szczegółowo w rozdziale 4.5.3.

Postępowanie

1. Do dwóch serii po 5 próbek (próby badane i kontrolne) odmierzyć podane w poniższej tabeli objętości buforu do reakcji oraz roztworu BApNA:

nr próby	bufor [µl]	0,1M BApNA [µl]
1	945	5
2	940	10
3	930	20
4	920	30
5	910	40

2. Do prób kontrolnych dodać po 50µl 1mM HCl z 20mM CaCl₂.
3. W próbach badanych reakcję enzymatyczną rozpocząć przez dodanie 50µl roztworu trypsyny 80µg/ml (*working solution*, por. rozdział 4.5.4), dokładnie wymieszać.
4. Reakcję prowadzić w temperaturze pokojowej.
5. **Po dokładnie 10 minutach** reakcję enzymatyczną przerwać przez dodanie 0,5ml 30% kwasu octowego, dokładnie wymieszać. Kwas octowy dodać również do prób kontrolnych.
6. Odczytać A_{410} poszczególnych prób wobec próby odczynnikowej (1ml buforu i 0,5ml kw. octowego).

7. Od wyników uzyskanych dla prób badanych odjąć wartości uzyskane dla odpowiadających im prób kontrolnych.

Opracowanie wyników:

1. Opisać niezmiennie warunki prowadzonych reakcji.
2. Obliczyć szybkość reakcji (ilość μmol pNA zwolnionej w ciągu 1 minuty reakcji w każdej z badanych prób).
3. Przedstawić, w formie tabeli, skład poszczególnych prób badanych (stężenia substratu, przy których wykonano oznaczenia) oraz uzyskane wyniki.
4. Wykreślić zależność szybkości reakcji od stężenia substratu w mieszaninie reakcyjnej.

Materiały i odczynniki

- roztwór trypsyny $80\mu\text{g/ml}$ w 1mM HCl z 20mM CaCl_2 (*working solution*) przygotowany w ćw. 4.5.4.
- bufor $0,1\text{M Tris/HCl}$, pH 8,0 z 20mM CaCl_2
- $0,1\text{M}$ roztwór substratu BApNA w dimetylosulfotlenku (DMSO)
- 1mM HCl z 20mM CaCl_2
- 30% roztwór kwasu octowego

4.5.6. Wpływ pH na aktywność trypsyny

Zasadę metody opisano szczegółowo w rozdziale 4.5.3.

Postępowanie

1. Przygotować po 5ml buforów:
 - $0,1\text{M}$ fosforanowy, pH 6,0 z 20mM CaCl_2
 - $0,1\text{M Tris/HCl}$, pH 7,0; 7,5; 8,5; 9,0; 9,5 z 20mM CaCl_2 (co 0,5 jednostki, w pomiarach należy **uwzględnić również bufor o pH 8,0!**)
2. Bezpośrednio przed rozpoczęciem doświadczenia przygotować 1ml roztworu trypsyny o stężeniu $80\mu\text{g/ml}$, poprzez rozcieńczenie wyjściowego roztworu enzymu (*stock solution*, por. rozdz. 4.5.4) wodą.
3. Do dwóch serii po 7 probówek (próby badane i kontrolne) odmierzyć po $935\mu\text{l}$ kolejnych buforów oraz po $15\mu\text{l}$ $0,1\text{M}$ roztworu BApNA.
4. Do prób kontrolnych dodać po $50\mu\text{l}$ wody.
5. W próbach badanych reakcję enzymatyczną rozpocząć przez dodanie $50\mu\text{l}$ roztworu trypsyny, dokładnie wymieszać.
6. Reakcję prowadzić w temperaturze pokojowej.
7. **Po dokładnie 10 minutach** reakcję enzymatyczną przerwać przez dodanie $0,5\text{ml}$ 30% kwasu octowego, dokładnie wymieszać. Kwas octowy dodać również do prób kontrolnych.
8. Odczytać A_{410} poszczególnych prób wobec odpowiednich prób odczynnikowych (1ml buforu o danym pH i $0,5\text{ml}$ kw. octowego).
9. Od wyników uzyskanych dla prób badanych odjąć wartości uzyskane dla odpowiadających im prób kontrolnych.

Opracowanie wyników:

1. Opisać niezmiennie warunki prowadzonych reakcji.
2. Obliczyć szybkość reakcji (ilość μmol pNA zwolnionej w ciągu 1 minuty reakcji w każdej z badanych prób).
3. Przedstawić, w formie tabeli, warunki prowadzenia reakcji w poszczególnych próbach badanych (pH, przy których wykonano oznaczenia) oraz uzyskane wyniki.
4. Wykreślić zależność szybkości reakcji od pH.

Materiały i odczynniki

- wyjściowy roztwór enzymu (*stock solution*) przygotowany zgodnie z ćw. 4.5.4
- bufor 0,1M Tris/HCl, pH 8,0 z 20mM CaCl₂
- 0,2M bufor Tris/HCl, pH 7,0; 7,5; 8,5 i 9,0
- 0,2M bufor octanowy, pH 6,0
- 0,1M CaCl₂
- 0,1M roztwór substratu BApNA w dimetylosulfotlenku (DMSO)
- 30% roztwór kwasu octowego

4.5.7. Wpływ temperatury na szybkość reakcji katalizowanej przez trypsynę

Zasadę metody opisano szczegółowo w rozdziale 4.5.3.

Postępowanie

1. Do dwóch serii po 7 probówek (próby badane i kontrolne) odmierzyć po 935μl buforu oraz po 15μl 0,1M roztworu BApNA.
2. Poszczególne pary prób badanych i kontrolnych preinkubować przez ok. 3min. w następujących temperaturach:
 - 0°C – łaźnia lodowa
 - 15°C – wirówka z odpowiednio ustawionym chłodzeniem
 - 25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 65°C – bloki grzejne z odpowiednio ustawioną temperaturą
3. Do prób kontrolnych dodać po 50μl 1mM HCl z 20mM CaCl₂.
4. W próbach badanych reakcję enzymatyczną rozpocząć przez dodanie 50μl roztworu trypsyny (*working solution*, por. rozdział 4.5.4), dokładnie wymieszać.
5. **Reakcję prowadzić w odpowiednich temperaturach** (próby kontrolne również inkubować w zadanych temperaturach).
6. **Po dokładnie 10 minutach** reakcję enzymatyczną przerwać przez dodanie 0,5ml 30% kwasu octowego, dokładnie wymieszać. Kwas octowy dodać również do prób kontrolnych.
7. Odczytać A₄₁₀ poszczególnych prób wobec próby odczynnikowej (1ml buforu i 0,5ml kw. octowego).
8. Od wyników uzyskanych dla prób badanych odjąć wartości uzyskane dla odpowiadających im prób kontrolnych.

Opracowanie wyników:

1. Opisać niezmiennie warunki prowadzonych reakcji.
2. Obliczyć szybkość reakcji (ilość μmol pNA zwolnionej w ciągu 1 minuty reakcji) w każdej z badanych prób.
3. Przedstawić, w formie tabeli, warunki prowadzenia reakcji w poszczególnych próbach badanych (temperatury, przy których wykonano oznaczenia) oraz uzyskane wyniki.
4. Wykreślić zależność szybkości reakcji od temperatury.
5. Wyznaczyć współczynnik temperaturowy Q₁₀ dla przedziału temperatur 25-35°C.

Materiały i odczynniki:

- roztwór trypsyny 80μg/ml w 1mM HCl z 20mM CaCl₂ (*working solution*) przygotowany w ćw. 4.5.4.
- bufor 0,1M Tris/HCl, pH 8,0 z 20mM CaCl₂
- 0,1M roztwór substratu BApNA w dimetylosulfotlenku (DMSO)
- 1mM HCl z 20mM CaCl₂
- 30% roztwór kwasu octowego

4.5.8. Termostabilność trypsyny

Zasadę metody opisano szczegółowo w rozdziale 4.5.3.

Postępowanie

1. Do 7 probówek Eppendorfa odmierzyć po 75μl roztworu enzymu (*working solution*, por. rozdział 4.5.4).
2. Każdą z prób inkubować przez 30min. w następujących temperaturach:
 - 0°C – łaźnia lodowa
 - 15°C – wirówka z odpowiednio ustawionym chłodzeniem
 - 25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 65°C – bloki grzejne z odpowiednio ustawioną temperaturą
3. Do 8 czystych probówek odmierzyć po 935μl buforu i po 15μl 0,1M roztworu BApNA.
4. Do 1 z probówek (próba kontrolna) dodać 50μl 1mM HCl z 20mM CaCl₂.
5. Reakcję enzymatyczną w kolejnych 7 probówkach rozpocząć przez dodanie po 50μl roztworów trypsyny inkubowanych w różnych temperaturach, dokładnie wymieszać.
6. **Reakcję prowadzić w temperaturze pokojowej.**
7. **Po dokładnie 10 minutach** reakcję enzymatyczną przerwać przez dodanie 0,5ml 30% kwasu octowego, dokładnie wymieszać. Kwas octowy dodać również do prób kontrolnych.
8. Odczytać A₄₁₀ poszczególnych prób wobec próby odczynnikowej (1ml buforu i 0,5ml kw. octowego).
9. Od uzyskanych wyników odjąć wartość uzyskaną dla próby kontrolnej.

Opracowanie wyników:

1. Opisać niezmiennie warunki prowadzonych reakcji.
2. Obliczyć aktywność trypsyny [J/ml] w każdej z badanych prób.
3. Przedstawić, w formie tabeli, warunki preinkubacji enzymu oraz uzyskane wyniki.
4. Wykreślić zależność aktywności trypsyny od temperatury preinkubacji.

Materiały i odczynniki:

- roztwór trypsyny 80μg/ml w 1mM HCl z 20mM CaCl₂ (*working solution*) przygotowany w ćw. 4.5.4.
- bufor 0,1M Tris/HCl, pH 8,0 z 20mM CaCl₂
- 0,1M roztwór substratu BApNA w dimetylosulfotlenku (DMSO)
- 1mM HCl z 20mM CaCl₂
- 30% roztwór kwasu octowego

4.6. TRYPSYNA I CHYMOTRYPSYNA – KINETYKA ENZYMATYCZNA

4.6.1. Parametry kinetyczne (K_M , k_{kat} , k_{kat}/K_M) hydrolizy BApNA katalizowanej przez trypsynę

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie parametrów: stałej Michaelisa (K_M), stałej szybkości reakcji (k_{kat}) i stałej specyficzności reakcji (k_{kat}/K_M) hydrolitycznego rozkładu syntetycznego substratu – BApNA – katalizowanego przez trypsynę. Trypsyna w środowisku obojętnym lub lekko zasadowym efektywnie przyspiesza hydrolizę BApNA do N-benzoilo-DL-argininy i p-nitroaniliny (pNA) (Rys. 4.14). Ilość p-nitroaniliny można oznaczyć spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy 410 nm, wykorzystując znajomość molowego współczynnika absorpcji – $\epsilon = 8\,800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Pomiar początkowej szybkości reakcji enzymatycznej w funkcji stężenia substratu ($v = f([BApNA])$) wykonuje się w warunkach dużego nadmiaru substratu w stosunku do enzymu ($[BApNA] \gg [E_0]$) i przy stałym stężeniu enzymu ($[E_0] = \text{const}$). Najpierw mierzy się początkową szybkość reakcji enzymatycznej jako przyrost ilości jednego z produktów reakcji – pNA – w czasie: $v = d[pNA]/dt$. Następnie do otrzymanych doświadczalnie punktów dopasowuje się krzywą zgodnie z modelem (równaniem) Michaelisa-Menten (patrz rozdział 4.4.1) i wyznacza parametry równania, jakimi są: stała

Michaelisa (K_M) i szybkość maksymalna reakcji (V_{max}). Parametr k_{kat} wyznacza się jako iloraz szybkości maksymalnej i stężenia enzymu: $k_{kat} = V_{max}/[E_0]$.

A. Wyznaczanie stężenia trypsyny przez pomiar absorbancji przy 280 nm

Postępowanie

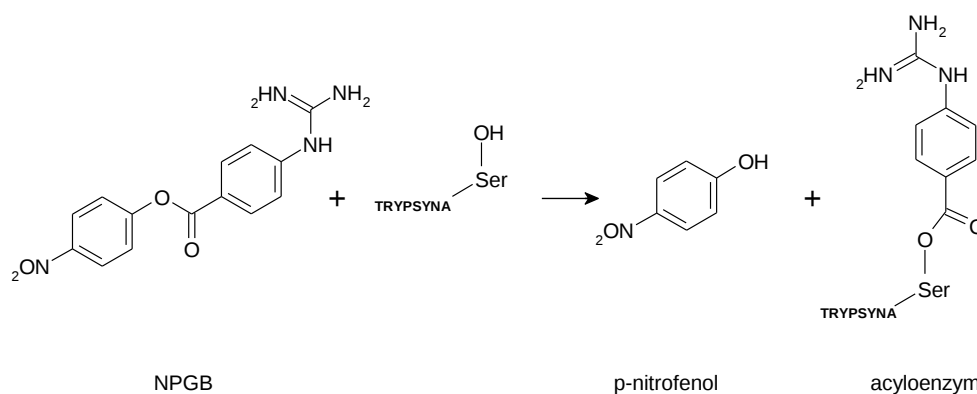
1. Do kuwety kwarcowej odmierzyć 2 ml wody i zarejestrować widmo absorpcyjne w zakresie 240 nm do 400 nm. Odczytać i zapisać wartość absorbancji przy 280 nm i 360 nm.
2. Do kuwety dodać 50 μ l roztworu trypsyny (**D**), dokładnie wymieszać i podobnie jak wyżej zarejestrować widmo oraz odczytać wartości absorbancji przy 280 nm i 360 nm.
3. Odpowiednio odjąć od siebie zmierzone wartości i obliczyć różnicę pomiędzy absorbancją 280 i 360 nm. Przyjmując, że A_{280} roztworu trypsyny o stężeniu 1 mg/ml wynosi 1,5 oraz, że masa cząsteczkowa równa jest 24 000 Da, obliczyć stężenie wyjściowego roztworu trypsyny wyrażone w mg/ml i M.

B. Wyznaczanie stężenia trypsyny przez miareczkowanie centrów aktywnych enzymu za pomocą NPGB

Chase T., Shaw E. (1970) Methods Enzymol. 19, 20-27.

Zasada metody

Jednym z etapów mechanizmu hydrolizy wiązań przez trypsynę jest tworzenie przejściowego, kowalencyjnego kompleksu enzymu z substratem – acyloenzymu. NPGB (p-nitrofenylo-4-guanidynobenzoatan) jest „wybuchowym” (błyskawicznie reagującym), syntetycznym i drobnocząsteczkowym substratem, z którym enzym szybko tworzy acyloenzym. W wyniku hydrolizy wiązania estrowego do roztworu uwalnia się tylko barwny p-nitrofenol (Rys. 4.15), podczas gdy druga część substratu (guanidynobenzoatan) bardzo wolno zwalnia się z acyloenzymu, blokując trwale kieszeń wiążącą trypsyny przed dostępem kolejnej cząsteczki substratu. Tym sposobem ilość wolnego p-nitrofenolu w roztworze, wyznaczana przez pomiar absorbancji przy 410 nm ($\epsilon = 16\,595\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), jest miarą ilości aktywnych cząsteczek enzymu. Stężenia substratu i enzymu w mieszaninie reakcyjnej muszą być tak dobrane, aby $[NPGB] \geq 0,9 [E]$.



Rys. 4.15. Reakcja hydrolizy NPGB katalizowana przez trypsynę

Postępowanie

1. Przygotować cztery plastikowe kuwety i odmierzyć do nich po 2 ml buforu weronalowego (**A**).
2. Do kuwety z buforem dodać 10 μ l 10 mM NPGB (**F**), zakleić ją parafilmem, wymieszać zawartość, włożyć do spektrofotometru, wyzerować wskazanie aparatu i przez około 20 sekund rejestrować absorbancję przy 410 nm.

3. Nie przerywając rejestracji wyjąć kuwetę z aparatu i dodać 50 μ l roztworu trypsyny (**D**), wymieszać, włożyć do spektrofotometru i dalej rejestrować absorbancję przez około minutę.
4. Odczytać absorbancję przed i po dodaniu enzymu do kuwety i z różnicy policzyć stężenie trypsyny w kuwecie i w roztworze wyjściowym.
5. Wykonać pomiary dla pozostałych prób i policzyć średnią z czterech oznaczeń.
6. Porównać stężenie oszacowane przez pomiar A_{280} z wyznaczonym przez miareczkowanie za pomocą NPGb i obliczyć procentowy udział aktywnego enzymu w całkowitej ilości białka.

C. Wyznaczenie stężenia BApNA poprzez jego całkowitą hydrolizę trypsyną

Zasada metody

W układzie enzym – substrat, w którym enzym sprawnie katalizuje przemianę substratu i spełniony jest warunek $[E] \geq [S]$ w krótkim czasie dochodzi do całkowitej hydrolizy substratu. Miara stężenia substratu (BApNA) jest zatem różnica A_{410} przed dodaniem odpowiedniej ilości trypsyny do kuwety z niewielką zawartością BApNA i po całkowitej jego hydrolizie. Stężenie substratu w mieszaninie reakcyjnej musi być tak dobrane, aby po całkowitej hydrolizie uzyskać A_{410} w miarodajnym zakresie, tzn. $0,05 < A_{410} < 1$.

Postępowanie

1. Obliczyć, jakie porcje wyjściowego roztworu substratu (**E**) i roztworu enzymu (**D**) wymiareczkowanego za pomocą NPGb należy dodać do plastikowej kuwety z 2 ml buforu reakcyjnego, aby spełnić warunki określone wyżej (**wyniki skonsultować z prowadzącym**).
2. Do trzech kuwet odmierzyć po 2 ml buforu reakcyjnego (**B**) i odpowiednią porcję roztworu BApNA (**E**).
3. Kuwetę zakleić parafilmem, wymieszać zawartość, umieścić w spektrofotometrze, wyzerować aparat i rozpocząć rejestrację A_{410} .
3. Po około 20 sekundach kuwetę wyjąć z aparatu i dodać odpowiednią porcję roztworu trypsyny (**D**), wymieszać, włożyć ponownie do aparatu i dalej rejestrować A_{410} , aż osiągnięcia stałej wartości (całkowita hydroliza substratu).
5. Z różnicy A_{410} przed dodaniem enzymu do kuwety i A_{410} końcowej obliczyć stężenie substratu w kuwecie i roztworze wyjściowym.
6. Wykonać pomiary dla pozostałych prób i policzyć średnią z trzech oznaczeń.

D. Zależność początkowej szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu

Postępowanie

1. Przygotować 30 ml roztworu trypsyny o stężeniu $2,5 \times 10^{-7}$ M: do próbówki typu Falcon o pojemności 50 ml nalać trochę buforu reakcyjnego (**B**), dodać odpowiednią porcję (**skonsultować z prowadzącym**) wyjściowego roztworu enzymu (**D**) wymiareczkowanego za pomocą NPGb i dopełnić do kreski buforem reakcyjnym. Dla podniesienia dokładności pomiaru dodawać porcję wyjściowego roztworu enzymu na wadze.
2. Do 10 plastikowych kuwet odmierzyć po 2 ml buforu reakcyjnego z trypsyną, zakleić parafilmem i bezpośrednio przed pomiarem dodać do każdej kuwety z osobna odpowiednią porcję wyjściowego roztworu BApNA (**E**) tak, aby jego stężenie w poszczególnych kuwetach rozłożone było równomiernie między $2,5 \times 10^{-4}$ M $< [BApNA] < 5 \times 10^{-3}$ M (**skonsultować z prowadzącym**).
3. Po dodaniu porcji roztworu substratu do każdej kuwety należy energicznie wymieszać jej zawartość, włożyć do spektrofotometru, wyzerować, mierzyć A_{410} przez około 60–90 sekund i odczytać wartość początkowej szybkości reakcji (dA_{410}/dt).
4. Obliczyć stężenie substratu w każdej z kuwet.
5. Odczytaną ze spektrofotometru wartość początkowej szybkości reakcji enzymatycznej (dA_{410}/dt) wyrazić w $d[pNA]/dt$ [mol/s].

6. Obliczyć żądane parametry, przeprowadzając nieliniową analizę danych według modelu Michaelisa-Menten.

Materiały i odczynniki

- bufor weronalowy (**A**): 0,1 M weronal (barbituran sodu), 20 mM CaCl₂, pH 8,3; przygotować 100 ml dla całej grupy ćwiczeniowej
- bufor reakcyjny (**B**): 0,1 M Tris, 20 mM CaCl₂, 5% DMSO, pH 8,3; przygotować 200 ml dla całej grupy ćwiczeniowej
- 0,001 M HCl z 20 mM CaCl₂ (**C**): przygotować 20 ml dla każdej grupy ćwiczeniowej
- roztwór trypsyny (**D**) : naważkę około 10 mg trypsyny rozpuścić w 1 ml 0,001 M HCl z 20 mM CaCl₂ (**C**); podczas ćwiczeń przechowywać na lodzie lub w lodówce; po wykonaniu ćwiczenia rozpipetować po 100 µl do probówek Eppendorfa, dokładnie opisać (podać stężenie) i zamrozić; roztwór będzie wykorzystywany na kolejnych zajęciach; odczynnik przygotowuje każdy zespół
- roztwór BApNA (**E**) – naważkę około 50 mg BApNA rozpuścić w około 500 µl DMSO; po zakończonych ćwiczeniach przechowywać w lodówce; roztwór będzie wykorzystywany na kolejnych ćwiczeniach; odczynnik przygotowuje każdy zespół
- 10 mM NPGb w DMSO (**F**): każda grupa ćwiczeniowa przygotowuje 1 ml roztworu substratu

Uwagi

Przy wyższych stężeniach substratu w mieszaniu reakcyjnej może się on wytrącać z roztworu. Aby tego uniknąć bufor reakcyjny powinien zawierać do kilku procent DMSO, a nie może zawierać detergentów (np. Tritonu). Po dodaniu roztworu substratu należy bardzo energicznie wymieszać zawartość kuwety.

W równoległym doświadczeniu, dodając inhibitor do mieszaniny reakcyjnej, można wyznaczyć typ inhibicji i stałą inhibicji.

4.6.2. Wyznaczanie stężenia BPTI przez miareczkowanie mianowanym roztworem trypsyny

Zasada metody

Eksperyment polega na wykreśleniu krzywej hamowania trypsyny przez BPTI (kompetycyjny inhibitor trypsyny; patrz rozdział 3.13.6). Przy założeniu, że inhibitor wiąże się z enzymem w stosunku stechiometrycznym (1:1) prosta, liniowa zależność aktywności enzymu (A_{trp}) o dokładnie znanym stężeniu od objętości dodanego roztworu inhibitora ($A_{\text{trp}} = f(V_{\text{BPTI}})$) pozwala wyznaczyć dokładne stężenie inhibitora w dodawanym roztworze. Ekstrapolacja zależności $A_{\text{trp}} = f(V_{\text{BPTI}})$ do punktu o zerowej aktywności enzymu pozwala obliczyć objętość roztworu inhibitora potrzebną do całkowitego zahamowania aktywności znanej porcji enzymu w roztworze.

Stężenia enzymu i inhibitora użyte w eksperymencie muszą być tak dobrane, aby były co najmniej 10-krotnie wyższe od stężenia równego stałej inhibicji (dysocjacji) – K_i – dla konkretnej pary enzym – inhibitor. Dla pary BPTI – β -trypsyna w pH 8,0, w temp. 25°C wartość K_i wynosi $6,0 \times 10^{-14}$ M.

A. Wyznaczenie stężenia BPTI przez pomiar A_{280}

Postępowanie

1. Do kuwety kwarcowej o pojemności 1 ml odmierzyć 1 ml wody i zarejestrować widmo absorpcyjne w zakresie 240 nm do 400 nm. Odczytać i zapisać wartości absorbancji przy 280 nm i 360 nm.
2. Do kuwety dodać 50 µl roztworu BPTI (**C**) o stężeniu 5 mg/ml, dokładnie wymieszać i podobnie jak wyżej zarejestrować widmo i wartości absorbancji. Odpowiednio odjąć od siebie zmierzone wartości i obliczyć różnicę pomiędzy absorbancją przy 280 i 360 nm. Przyjmując $\epsilon_{280} = 5\,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oraz masę cząsteczkową równą 6 500 Da obliczyć stężenie wyjściowego roztworu inhibitora wyrażone w mg/ml i M.

3. Rozcieńczony roztwór inhibitora opisać i pozostawić do kolejnych ćwiczeń.

B. Miareczkowanie mianowanego roztworu trypsyny roztworem BPTI

Postępowanie

1. Do 10 plastikowych kuwet odmierzyć po 2 ml roztworu trypsyny w buforze reakcyjnym (**B**) o stężeniu około $2,5 \times 10^{-7}$ M ($[E_0]$).
2. Do pierwszej kuwety nie dodawać roztworu inhibitora. Do kolejnych kuwet dodać odpowiednie porcje roztworu inhibitora tak, aby jego stężenie w poszczególnych kuwetach rozkładało się równomiernie w granicach $0,1[E_0] \leq [BPTI] \leq 0,9[E_0]$. W tym celu należy odpowiednio rozcieńczyć na wadze wyjściowy roztwór inhibitora (**C**) tak, aby dodawanie do kuwet planowanych jego porcji było obciążone możliwie małym błędem. Wszystkich obliczeń należy dokonać opierając się na stężeniu BPTI w wyjściowym roztworze wyznaczonym przez pomiar A_{280} . **Uzyskane wyniki skonsultować z prowadzącym.** Kuwety zakleić parafilmem i wymieszać ich zawartość.
3. Bezpośrednio przed pomiarem do każdej kuwety dodać 10 μ l 0,1 M BApNA (**D**), wymieszać, włożyć do spektrofotometru, wyzerować aparat i mierzyć przyrost A_{410} przez około 60 sekund. Zapisać wynik w postaci początkowej szybkości reakcji (dA_{410}/dt).
4. Wykreślić zależność początkowej szybkości reakcji od objętości dodawanego roztworu inhibitora.
5. Na podstawie równania prostej obliczyć objętość roztworu inhibitora, jaka powinna być dodana do roztworu enzymu, aby go całkowicie zahamować.
6. Znając dokładne stężenie enzymu w kuwecie i zakładając, że trypsyna oddziałuje z BPTI w stosunku 1:1, policzyć stężenie inhibitora w roztworze dodawanym do kuwet oraz w roztworze wyjściowym.
7. Porównać wyznaczone stężenie BPTI z oszacowanym na podstawie A_{280} . Obliczyć procentowy udział aktywnego inhibitora w ilości białka wyznaczonej przez pomiar A_{280} .

Materiały i odczynniki

- bufor reakcyjny (**A**): 0,1 M Tris, 20 mM CaCl_2 , pH 8,3; przygotować 200 ml dla całej grupy ćwiczeniowej
- roztwór trypsyny (**B**): przygotować dla każdego zespołu ćwiczeniowego 30 ml roztworu enzymu o stężeniu $2,5 \times 10^{-7}$ M w sposób opisany w doświadczeniu 4.6.1 D
- roztwór BPTI (**C**): naważkę około 2,5 mg inhibitora rozpuścić w 0,5 ml wody; po zakończonych ćwiczeniach roztwór rozpipetować po 100 μ l do probówek Eppendorfa, dokładnie opisać i zamrozić; roztwór będzie wykorzystywany na kolejnych ćwiczeniach; odczynnik przygotowuje każdy zespół ćwiczeniowy
- 0,1 M BApNA w DMSO (**D**): przygotować 100 μ l dla każdego zespołu ćwiczeniowego
- 0,1 M bufor weronalowy z 20 mM CaCl_2 , pH 8,3 z doświadczenia 4.6.1
- 10 mM NPGB w DMSO z doświadczenia 4.6.1

4.6.3. Pomiar równowagowej stałej asocjacji (K_a) oddziaływania α -chymotrypsyna – BPTI

Empie M., Laskowski, M., Jr. (1982) Biochemistry 21, 2274-2284.

Zasada metody

Stała równowagi reakcji tworzenia kompleksu enzym – inhibitor kompetycyjny ($E + I \rightleftharpoons EI$) dana jest wzorem: $K = [EI]/[E] \times [I]$ i nazywana jest stałą asocjacji (K_a). Odwrotność stałej asocjacji, nazywana stałą inhibicji (K_I): $1/K_a = K_I = [E] \times [I]/[EI]$, jest stałą równowagi reakcji rozpadu kompleksu enzym – inhibitor ($EI \rightleftharpoons E + I$). Przekształcając wzór $K = [EI]/[E] \times [I]$ w kierunku wyprowadzenia wyrażenia na stężenie wolnego enzymu $[E]$ otrzymujemy równanie:

$$[E] = \frac{1}{2} \left([E_0] - [I_0] - \frac{1}{K_a} + \sqrt{\left([E_0] + [I_0] + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4[E_0][I_0]} \right)$$

gdzie: $[E_0]$ – całkowite stężenie enzymu: $[E_0] = [E] + [EI]$, $[I_0]$ – całkowite stężenie inhibitora: $[I_0] = [I] + [EI]$, $[E]$ i $[I]$ – odpowiednio, stężenie wolnego enzymu i wolnego inhibitora, $[EI]$ – stężenie kompleksu enzym – inhibitor

Stałą asocjacji można zatem eksperymentalnie wyznaczyć jako parametr powyższego równania, mierząc stężenie wolnego enzymu $[E]$ (resztkową aktywność enzymu) w kolejnych próbach w funkcji całkowitego stężenia inhibitora $[I_0]$ przy danym, stałym, całkowitym stężeniu mianowanego enzymu. Stężenie wolnego enzymu, pozostającego w równowadze z kompleksem enzym – inhibitor, można wyznaczyć mierząc jego aktywność i porównując ją z aktywnością mianowanego roztworu samego enzymu, bez dodatku inhibitora.

Eksperyment wyznaczenia K_a polega na tym, że do każdej z serii kuwet z roztworem enzymu o stałym, znanym stężeniu $[E_0]$ w buforze reakcyjnym należy dodać odpowiednie, wzrastające porcje roztworu inhibitora. Następnie w celu wykazania aktywności wolnego enzymu do każdej z kuwet dodać należy tę samą porcję substratu i zarejestrować początkową szybkość reakcji enzymatycznej. Planując taki eksperyment spełnić należy kilka dodatkowych warunków:

- eksperyment należy prowadzić w dolnym regionie krzywej hamowania enzymu przez inhibitor, przy takim stałym stężeniu całkowitym enzymu $[E_0]$, aby był spełniony warunek $2 < K_a \times [E_0] < 40$
- stężenie całkowite inhibitora $[I_0]$ w kolejnych próbach powinno być równomiernie rozłożone w granicach: $0 \leq [I_0] \leq 2[E_0]$; w przypadku bardzo słabego oddziaływania enzym – inhibitor ($K_a \leq 10^3 \text{ M}^{-1}$) można zapomnieć o tym warunku i wymuszać tworzenie kompleksu wysokim stężeniem inhibitora
- przed dodaniem substratu do mieszaniny reakcyjnej należy być pewnym, że układ jest w stanie równowagi chemicznej, tzn. należy inkubować enzym z inhibitorem w buforze reakcyjnym przez czas (t_{ink}) około dziesięciokrotnie dłuższy od czasu połowkowego ($t_{1/2}$) tworzenia kompleksu EI – $t_{\text{ink}} = 10 t_{1/2}$, przy czym $t_{1/2} = 1/k_{\text{on}} \times [I_0]$, gdzie k_{on} jest stałą szybkości tworzenia kompleksu (dla oddziaływania chymotrypsyna – BPTI w warunkach prowadzonej reakcji $k_{\text{on}} = 3,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
- substrat i jego stężenie muszą być dobrane adekwatnie do całkowitego stężenia enzymu $[E_0]$, przy jakim prowadzimy reakcje; gdy $[E_0]$ jest niskie (wysoka K_a) stosować należy substrat o bardzo dobrych parametrach kinetycznych (niskie K_M , wysokie k_{kat}), gdy $[E_0]$ jest wysokie (niska K_a) stosować należy substraty o słabych parametrach kinetycznych (wysokie K_M , niskie k_{kat}); stężenie substratu w mieszaninie reakcyjnej $[S]$ powinno być od kilkuset do tysiąca razy wyższe od stężenia $[E_0]$.

A. Wyznaczanie stężenia roztworu chymotrypsyny przez pomiar absorbancji przy 280 nm

Postępowanie

1. Do kuwety kwarcowej odmierzyć 2 ml wody i zarejestrować widmo absorpcyjne w zakresie 240 nm do 400 nm. Odczytać i zapisać wartość absorbancji przy 280 nm i 360 nm.
2. Do kuwety dodać 50 μl roztworu chymotrypsyny (B), dokładnie wymieszać i podobnie jak wyżej zarejestrować widmo i odpowiednie wartości absorbancji.
3. Odpowiednio odjąć od siebie zmierzone wartości i przyjmując dla chymotrypsyny $\epsilon_{280} = 51\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oraz masę cząsteczkową równą 25 000 Da obliczyć stężenie wyjściowego roztworu enzymu wyrażone w mg/ml i M.

B. Wyznaczanie stężenia roztworu chymotrypsyny przez miareczkowanie centrów aktywnych enzymu za pomocą NPGB

Chase T., Shaw E. (1970) Methods Enzymol. 19, 20-27.

Zasada metody

Stężenie aktywnej chymotrypsyny w próbce oznacza się w sposób analogiczny do opisanego w rozdziale 4.6.1 B. Modyfikacja w stosunku do oznaczania stężenia trypsyny wynika z nietrwałego charakteru acyloenzymu tworzonego przez chymotrypsynę. Ze względu na szybszy rozkład acyloenzymu, po dodaniu chymotrypsyny do kuwety obserwujemy ciągły przyrost A_{410} , zamiast stałej wartości A_{410} jak w przypadku miareczkowania trypsyny.

Postępowanie

1. Do czterech plastikowych kuwet odmierzyć po 2 ml buforu weronalowego i 10 μ l 10 mM NPGB w DMSO.
2. Poszczególne kuwety zakleić parafilmem, wymieszać zawartość, włożyć do spektrofotometru, wyzerować wskazanie aparatu i przez około 20 sekund rejestrować A_{410}
3. Nieprzerwywając rejestracji wyjąć kuwetę z aparatu i dodać 50 μ l roztworu chymotrypsyny (**B**). Wymieszać, włożyć do spektrofotometru i dalej rejestrować absorbancję przez około minutę.
4. Odczytać absorbancję przed dodaniem substratu do kuwety oraz wyznaczyć absorbancję po dodaniu enzymu do kuwety, ekstrapolując krzywą opisującą wzrost A_{410} w czasie do momentu dodania enzymu do kuwety.
5. Z różnicy A_{410} policzyć stężenie chymotrypsyny w kuwecie i w roztworze wyjściowym.
6. Policzyć średnią z czterech oznaczeń. Porównać stężenie oszacowane przez pomiar A_{280} z wyznaczonym przez miareczkowanie za pomocą NPGB i obliczyć procentowy udział aktywnego enzymu w całkowitej ilości białka.

C. Zależność stężenia wolnego enzymu [E] pozostającego w równowadze z inhibitorem od całkowitego stężenia inhibitora [I_0]

Uwaga! Wykonując to doświadczenie należy bardzo starannie dodawać do kuwet zarówno roztwór inhibitora jak i substratu. Od dokładności pipetowania tych roztworów zależy wynik ćwiczenia.

Postępowanie

1. Przygotować 25 ml roboczego roztworu chymotrypsyny: do próbki typu Falcon o pojemności 50 ml nalać buforu reakcyjnego (**A**), dodać odpowiednią porcję (skonsultować z prowadzącym) wyjściowego roztworu chymotrypsyny (**B**), aby stężenie enzymu w roztworze wynosiło 2×10^{-6} M i dopełnić do kreski buforem reakcyjnym.
2. Do 10 plastikowych kuwet odmierzyć po 2 ml roboczego roztworu chymotrypsyny w buforze reakcyjnym, zakleić parafilmem.
3. Do trzech, czterech pierwszych kuwet nie dodawać niczego ($[E] = [E_0]$), a do kolejnych dodać takie porcje roztworu BPTI (**C**), aby stężenie inhibitora w kolejnych kuwetach wzrastało równomiernie w granicach $0,2[E_0] \leq [BPTI] \leq 2[E_0]$ (**skonsultować z prowadzącym ćwiczenia**).
4. Zawartość kuwet wymieszać i bezpośrednio przed pomiarem dodać do każdej 20 μ l 250 mM Suc-Phe-pNA (**D**).
5. Po dodaniu porcji roztworu substratu do każdej kuwety należy energicznie wymieszać jej zawartość, włożyć do spektrofotometru, wyzerować, mierzyć A_{410} przez około 60–90 sekund i odczytać wartość początkowej szybkości reakcji (dA_{410}/dt).
6. Obliczyć całkowite stężenie inhibitora [I_0] w każdej z kuwet.
7. Obliczyć stężenie wolnego enzymu [E] w każdej kuwecie, porównując zmierzoną początkową szybkość reakcji enzymatycznej (aktywność) w każdej kuwecie ze średnią z początkowych szybkości reakcji uzyskanych dla kuwet bez inhibitora, gdzie $[E] = [E_0]$.
8. Obliczyć stałą asocjacji (K_a) oddziaływania α -chymotrypsyny z BPTI, przeprowadzając nieliniową analizę danych $[E] = f([I_0])$ według równania przedstawionego na początku tego rozdziału.

Uwaga! O poprawności stałej asocjacji wyznaczonej tą metodą świadczy zgodność (dopuszczalny błąd rzędu 2-3%) wyznaczonych eksperymentalnie (wystandaryzowanych) całkowitych stężeń enzymu ($[E_0]$) i inhibitora ($[I_0]$) z obliczonymi na podstawie równania.

Materiały i odczynniki

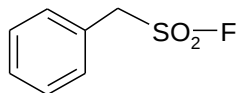
- bufor reakcyjny (**A**): 0,05 M HEPES, 20 mM CaCl_2 , pH 7,5; przygotować 200 ml dla całej grupy ćwiczeniowej
- roztwór chymotrypsyny (**B**): naważkę około 10 mg chymotrypsyny rozpuścić w 1 ml 0,001 M HCl z 20 mM CaCl_2 ; po wykonaniu ćwiczenia rozpipetować po 50 μl do probówek Eppendorfa, dokładnie opisać i zamrozić; roztwór będzie wykorzystywany na kolejnych ćwiczeniach; odczynnik przygotowuje każdy zespół
- roztwór BPTI (**C**): wykorzystać roztwór z doświadczenia 0; jeśli trzeba przygotować nowy roztwór inhibitora, to należy go zmiareczkować (rozdział 0 B); odczynnik przygotowuje każdy zespół
- 250 mM Suc-Phe-pNA w DMSO (**D**): przygotować 2,5 ml roztworu substratu dla całej grupy ćwiczeniowej i poporcjować po około 300 μl dla każdego zespołu ćwiczeniowego

4.6.4. Modyfikacja trypsyny i chymotrypsyny za pomocą PMSF i TLCK

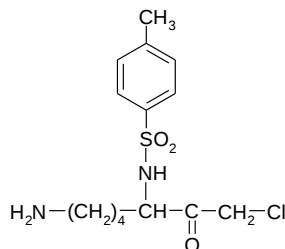
Zasada metody

Wiele syntetycznych związków chemicznych reaguje z reaktywnymi grupami (np.: -OH, - NH_2 , -SH) łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych, tworząc nieodwracalne, kowalencyjne kompleksy (bardziej lub mniej trwałe) i modyfikując właściwości białek, w tej liczbie enzymów. W zależności od budowy chemicznej związku te mogą być mniej lub bardziej selektywne w stosunku do reaktywnych grup białek i w stosunku do kieszeni wiążących substraty w enzymach. Tego typu modyfikacje mogą służyć identyfikacji reszt zaangażowanych w mechanizm katalizy enzymatycznej i klasyfikacji enzymów.

Budowę drobnocząsteczkowych nieodwracalnych inhibitorów: PMSF (fenylometylosulfofluorku) i TLCK (chlorometyloketon $\text{N}\alpha$ -tozylo-L-lizyny) przedstawiono na Rys. 4.16 i 4.17.



Rys. 4.16. PMSF



Rys. 4.17. TLCK

A. Modyfikacja trypsyny za pomocą PMSF

Postępowanie

1. Roztwór trypsyny przeznaczony do modyfikacji (**F**) rozdzielić do dwóch probówek Eppendorfa na dwie porcje po około 0,25 ml.
2. Do jednej dodać sześć porcji 50mM PMSF (**D**) o objętości 5 μl w odstępach około 10. minutowych, przygodnie mieszać.
3. Do drugiej porcji, stanowiącej kontrolę niemodyfikowanego enzymu, dodać 30 μl acetonu.

B. Modyfikacja chymotrypsyny za pomocą PMSF

Postępowanie

1. Roztwór chymotrypsyny przeznaczony do modyfikacji (**H**) rozdzielić do probówek Eppendorfa na dwie porcje po około 0,5 ml.

2. Do jednej dodać sześć porcji 50 mM PMSF (**D**) o objętości 10 μ l w odstępach około 10. minutowych, przegrodzić mieszać.
3. Do drugiej porcji, stanowiącej kontrolę niemodyfikowanego enzymu, dodać 60 μ l acetonu.

C. Modyfikacja trypsyny za pomocą TLCK

Postępowanie

1. Roztwór trypsyny przeznaczony do modyfikacji (**G**) rozdzielić do probówek Eppendorfa na dwie porcje i włożyć do łaźni lodowej (2°C).
2. Do jednej porcji dodać 50 μ l roztworu TLCK (**E**).
3. Do drugiej porcji, stanowiącej kontrolę niemodyfikowanego enzymu, dodać 50 μ l DMSO.
4. Próby inkubować 60 minut w łaźni lodowej, mieszając od czasu do czasu.

D. Modyfikacja chymotrypsyny za pomocą TLCK

Postępowanie

1. Roztwór chymotrypsyny przeznaczony do modyfikacji (**I**) rozdzielić do probówek Eppendorfa na dwie porcje i włożyć do łaźni lodowej (2°C).
2. Do jednej porcji dodać 50 μ l roztworu TLCK (**E**), wymieszać.
3. Do drugiej porcji, stanowiącej kontrolę niemodyfikowanego enzymu, dodać 50 μ l DMSO.
4. Próby inkubować 60 minut w łaźni lodowej, mieszając od czasu do czasu.

E. Oznaczanie aktywności trypsyny po modyfikacji PMSF i TLCK

Postępowanie

1. Przygotować cztery plastikowe kuwety zawierające po 2 ml buforu reakcyjnego (**B**).
2. Do kolejnych kuwet dodać po 50 μ l roztworu trypsyny: niemodyfikowanej PMSF (4.6.4 A), modyfikowanej PMSF (4.6.4 A), niemodyfikowanej TLCK (4.6.4 C) oraz modyfikowanej TLCK (4.6.4 C). Kuwety zakleić parafilmem i wymieszać ich zawartość.
3. Przy spektrofotometrze do każdej kuwety dodać 10 μ l 0,1 M BApNA (**J**), wymieszać, włożyć do aparatu, wyzerować i przez jedną minutę śledzić przyrost A_{410} . Zapisać początkową szybkość reakcji enzymatycznej, która jest miarą aktywności enzymu.
4. Porównać wyniki dla prób z modyfikowaną i niemodyfikowaną trypsyną i obliczyć procent zahamowanego enzymu.

F. Oznaczanie aktywności chymotrypsyny po modyfikacji PMSF i TLCK

Postępować analogicznie jak w przypadku wykazywania aktywności trypsyny (rozdział 4.6.4 E) z tą różnicą, że do kuwet należy dodawać po 50 μ l odpowiednio niemodyfikowanych i modyfikowanych roztworów chymotrypsyny (4.6.4 B i D) a jako substratu – 20 μ l 250 mM Suc-Phe-pNA (**K**).

Materiały i odczynniki

- bufor do modyfikacji za pomocą PMSF (**A**): 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,12 M CaCl_2 , 10% (v/v) metanol, pH 8,0; przygotować 50 ml dla całej grupy ćwiczeniowej
- bufor reakcyjny (**B**): 0,1 M Tris, 20 mM CaCl_2 , 5% (o/o) DMSO, pH 8,3; przygotować 1 litr dla całej grupy ćwiczeniowej
- bufor do modyfikacji TLCK (**C**): do buforu reakcyjnego (**B**) dodać DMSO do końcowego stężenia 10% (o/o); przygotować 20 ml dla całej grupy ćwiczeniowej
- 50 mM PMSF w acetonie (**D**): przygotować 1 ml dla całej grupy ćwiczeniowej
- roztwór TLCK (**E**): około 1 mg inhibitora rozpuścić w 100 μ l DMSO; przygotowuje każdy zespół ćwiczeniowy
- roztwór trypsyny do modyfikacji za pomocą PMSF (**F**): odpowiednio rozcieńczyć roztwór enzymu z doświadczenia 4.6.1, tak aby uzyskać 0,5 ml roztworu enzymu o stężeniu

- 1 mg/ml (około $4,2 \times 10^{-5}$ M) w buforze do modyfikacji PMSF (A); w przypadku braku roztworu enzymu z poprzednich ćwiczeń, naważyć 1 mg trypsyny i rozpuścić w 1 ml buforu do modyfikacji (A); odczynnik przygotowuje każdy zespół ćwiczeniowy
- roztwór trypsyny do modyfikacji TLCK (G): odpowiednio rozcieńczyć roztwór enzymu przygotowany do doświadczenia 4.6.1, tak aby uzyskać 1 ml roztworu enzymu o stężeniu 1 mg/ml (około $4,2 \times 10^{-5}$ M) w buforze do modyfikacji TLCK (C); roztwór włożyć do łaźni lodowej (2°C); w przypadku braku roztworu enzymu z poprzednich ćwiczeń naważyć 1 mg trypsyny i rozpuścić w 1 ml buforu C; odczynnik przygotowuje każdy zespół ćwiczeniowy
- roztwór chymotrypsyny do modyfikacji PMSF (H): naważkę 10 mg enzymu rozpuścić w 1 ml buforu do modyfikacji PMSF (A); odczynnik przygotowuje każdy zespół ćwiczeniowy
- roztwór chymotrypsyny do modyfikacji za pomocą TLCK (I): 10 mg enzymu rozpuścić w 1 ml buforu do modyfikacji TLCK (C); roztwór umieścić w łaźni lodowej (2°C); odczynnik przygotowuje każdy zespół ćwiczeniowy
- 0,1 M BApNA w DMSO (J): odpowiednio rozcieńczyć roztwór BApNA przygotowany wcześniej (rozdział 4.6.1) lub przygotować świeży roztwór z odpowiedniej naważki BApNA; każdy zespół ćwiczeniowy przygotowuje 0,5 ml roztworu substratu
- 250 mM Suc-Phe-pNA w DMSO (K): każdy zespół ćwiczeniowy przygotowuje 0,1 ml roztworu substratu

4.7. FOSFATAZY

Nazwą „fosfatazy” określa się potocznie hydrolazy monoestrów fosforanowych (fosfohydrolazy monoestrów fosforanowych, fosfomonoesterazy). Fosfatazy katalizują hydrolizę monoestrów fosforanowych według schematu:



R – reszta organiczna

Enzymy te należą więc do klasy hydrolaz (EC 3), działających na wiązania estrowe (podklasa 3.1) i hydrolizujących monoestry fosforanowe (pod-podklasa 3.1.3). Naturalnymi substratami dla fosfataz są estry fosforanowe białek, tłuszczowców, nukleotydów i wielu innych związków. Specyficzność fosfataz jest bardzo różnorodna. Wiele z nich to enzymy wysoce nieswoiste, tzn. nie wykazujące większej specyficzności względem części organicznej hydrolizowanego estru, inne hydrolizują tylko ściśle określone estry fosforanowe.

Obok funkcji hydrolitycznej, wiele fosfataz wykazuje funkcję transferazową, czyli zdolność przenoszenia reszt fosforanowych. Donorami reszt fosforanowych mogą być np. fosfoenolopirogronian, p-nitrofenylofosforan, glukoza-1-fosforan, zaś akceptorami alkohole, cukry i inne związki.

Wśród fosfomonoesteraz występuje grupa enzymów działająca optymalnie w warunkach zasadowych (pH ok. 9,0), zwana fosfatazami zasadowymi, oraz grupa o optimum pH w zakresie kwaśnym (pH ok. 5,0) – fosfatazy kwaśne.

Fosfatazy zasadowe (EC 3.1.3.1), są enzymami szeroko rozpowszechnionymi u Prokaryota, zwierząt bezkręgowych i kręgowców, natomiast w niewielkiej ilości występują u roślin wyższych. Zasadowa fosfataza ssaków, w tym fosfataza ludzka, występuje w postaci kilku izoenzymów charakterystycznych dla niektórych organów lub tkanek, np. wątroby, kości, łożyska. Różnią się one właściwościami fizykochemicznymi (masa molowa, optimum pH działania, podatność na inhibicję, ruchliwość elektroforetyczna). Enzymy te pełnią istotne funkcje m.in. w procesie kostnienia, wchłaniania cukrów w jelicie i w kanalikach nerkowych oraz w procesach transportu fosforanu. Fosfataza zasadowa wymaga dla pełnej aktywności obecności jonów magnezu; jej aktywatorami, mogą być kationy manganu i kobaltu. Hamowanie aktywności enzymatycznej zachodzi w obecności produktu reakcji – anionu fosforanowego.

Aktywność fosfatazową związaną z obecnością izoenzymów tkankowych wykazują także płyny ustrojowe. Oznaczenie aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy krwi ma znaczenie diagnostyczne. Surowica dorosłych ludzi zawiera głównie enzym pochodzenia wątrobowego,

mniejsze ilości formy jelitowej (ok. 20%) oraz śladowe ilości enzymu pochodzenia kostnego. W surowicy dzieci fosfataza pochodzenia kostnego występuje w większych ilościach. Aktywność całkowita fosfatazy zasadowej w surowicy wzrasta w niektórych stanach patologicznych, zwłaszcza w przypadku chorób układu kostnego. Zaburzeniu ulegają także proporcje ilościowe pomiędzy izoenzymami tkankowymi. Wartości znacznie przekraczające normę dla aktywności tego enzymu (20–40-krotnie) obserwuje się np. przy pierwotnym nowotworze kości i przerzutach nowotworów gruczołu sterczowego do kości. W schorzeniach tych wzrasta głównie aktywność formy kostnej enzymu. Fosfataza pochodzenia łożyskowego występuje w surowicy kobiet ciężarnych, a poziom jej aktywności jest markerem prawidłowego funkcjonowania łożyska w czasie ciąży.

Fosfatazy zasadowe występujące u roślin odróżnia od fosfataz zwierzęcych absolutna specyficzność substratowa. Ich przykładem są cytosolowe fosfatazy biorące udział w procesie syntezy sacharozy z fosfotrioz.

Fosfatazy kwaśne (EC 3.1.3.2) są szeroko rozpowszechnione u wszystkich organizmów żywych. Stanowią one dużą grupę enzymów, zróżnicowanych pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Nawet w obrębie jednej tkanki aktywność kwaśnej fosfatazy wykazuje bardzo często kilka różnych enzymów. Bez względu na źródło pochodzenia ich wspólną cechą jest zwykle niska specyficzność substratowa. Fosfatazy kwaśne, w odróżnieniu od fosfataz zasadowych, nie wymagają obecności jonów magnezu dla swojej aktywności, choć wiele z nich może być aktywowanych przez kationy dwuwartościowe (magnezu, wapnia, manganu). Typowymi inhibitorami tej grupy enzymów są m.in. fosforany, winiany i fluorki.

W komórkach eukariotycznych fosfataza kwaśna zlokalizowana jest głównie w lizosomach, dlatego jest ona enzymem markerowym tych organelli. W diagnostyce klinicznej istotne znaczenie ma fosfataza z gruczołu sterczowego. Jej aktywność w surowicy krwi znacznie wzrasta w stanach nowotworowych pozwalając na wczesne rozpoznanie tego schorzenia za pomocą badania laboratoryjnego.

Kwaśne fosfatazy roślinne, w przeciwieństwie do roślinnych fosfataz alkalicznych, nie wykazują absolutnej specyficzności substratowej. Pomimo tego wyodrębnia się dwie kategorie tych enzymów w oparciu o ich względną selektywność substratową. Do pierwszej należą enzymy zupełnie niespecyficzne lub o specyficzności bardzo niskiej, którym przypisywana jest ogólna funkcja w transporcie i przemianach fosforanu. Do drugiej należą enzymy o zdefiniowanej (choć nie absolutnej) specyficzności substratowej, które prawdopodobnie pełnią ściśle określone funkcje metaboliczne, np. fosfataza 3-fosfoglicerynianowa lub fosfataza fosfoenolopirogronianowa.

4.7.1. Preparacja fosfatazy kwaśnej z bulw ziemniaków

Zasada metody

W preparacji fosfatazy metodą przedstawioną poniżej wykorzystano m.in. chromatografię jonowymienną na DEAE-celulozie w pH 7,5 oraz filtrację żelową na Bio-Gel P-150. Zasady rozdzielania białek w obydwóch typach chromatografii przedstawiono odpowiednio w rozdziałach 3.13 i 3.9.8.

Postępowanie

Ekstrakcja i wytrącanie białek etanolem

1. Jeden ziemniak (ok. 100 g) wymyć zimną, bieżącą wodą, obrać, zetrzeć na tarce, a następnie zalać 0,1 M buforem octanowym o pH 3,6 z dodatkiem 3 mM disiarczany (IV) potasu $K_2S_2O_5$ (pirosiarczyny potasu). Objętość buforu powinna stanowić połowę objętości ziemniaków.
2. Po schłodzeniu do temp. 4°C mieszaninę poddać homogenizacji i odstawić do zamrażarki na 10 minut, przegrodnie mieszając. Po tym czasie homogenat przecisnąć przez podwójną gazę.
3. Uzyskany przesącz wirować w temp. 4°C (15 minut, ok. 3 000 obr./min). W klarownym supernatancie oznaczyć A_{280} oraz aktywność kwaśnej fosfatazy (rozdział 0).
4. Do próbki Eppendorfa odmierzyć 1 ml supernatantu wyjściowego (Preparat 1) i pozostawić w zamrażarce.

5. Zmierzyć objętość supernatantu i dodać do niego wymrożonego etanolu do końcowego stężenia 60%. Pozostawić do wytrącenia białek na 15 minut w temp. 4°C.
6. Zawiesinę odwirować. Supernatant odrzucić, a osad zawiesić w 10 ml wody destylowanej i przenieść do worka dializacyjnego. Preparat dializować wobec wody destylowanej przez ok. 20 godz. w temp. 4°C (objętość roztworu w czasie dializy może wzrosnąć około trzykrotnie, dlatego należy dobrać worek dializacyjny o odpowiedniej wielkości).
7. Zawartość worka dializacyjnego odwirować w warunkach jak wyżej. Osad odrzucić. Zmierzyć objętość supernatantu (Preparat 2), oznaczyć w nim A_{280} oraz aktywność kwaśnej fosfatazy (rozdział 0).
8. Z supernatantu oznaczonego jako Preparat 2 pobrać porcję o objętości 1 ml i zamrozić w probówce Eppendorfa. Pozostałość preparatu zamrozić w całości.

Chromatografia jonowymienna na DEAE-celulozie

1. Kolumnę o wymiarach 50 cm × 10 mm wypełnić DEAE-celulozą i zrównoważyć 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.
2. Na kolumnę nanieść 1,5 ml Preparatu 2 (jeżeli preparat po rozmrożeniu jest mętny, należy go przesączyć przez mały sączek).
3. Białka nieadsorbujące się wymywać 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, aż do zaniku A_{280} w wycieku z kolumny; zbierać frakcje o objętości 5 ml.
4. Elucję białek zaadsorbowanych prowadzić 0,2 M Tris-HCl pH 7,5, zbierając 2 ml frakcje przy szybkości wypływu 1 ml/min.
5. W poszczególnych frakcjach oznaczyć A_{280} . We frakcji o najwyższej absorbancji przy 280 nm oznaczyć aktywność kwaśnej fosfatazy (rozdział 0).
6. Podać aktywność właściwą kwaśnej fosfatazy dla białek Preparatu 1, Preparatu 2 oraz szczytowej frakcji białek adsorbujących się na DEAE-celulozie (Preparat 3).
7. Na podstawie powyższych oznaczeń obliczyć aktywność właściwą, stopień oczyszczenia oraz wydajność preparacji. Wyniki zebrać w tabeli zamieszczonej na str. 36.

Uwaga! Jeżeli planowane jest dalsze oczyszczanie preparatu kwaśnej fosfatazy drogą sączenia molekularnego należy:

- oznaczyć aktywność kwaśnej fosfatazy w poszczególnych frakcjach (rozdział 4.7.3.2),
- wykreślić profil elucji białka oraz aktywności fosfatazowej.

Frakcje o najwyższej aktywności właściwej połączyć, dializować przez 24 godz. do 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, a następnie zliofilizować.

Sączenie molekularne na Bio-Gel P-150

1. Kolumnę o wymiarach 900 cm × 10 mm wypełnić napęczniałym Bio-Gel P-150 i zrównoważyć złoże 50 mM Tris-HCl o pH 7,5.
2. Zliofilizowany preparat fosfatazy kwaśnej (oczyszczony w chromatografii jonowymiennej na DEAE-celulozie) rozpuścić w 2,5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Zamrozić 0,5 ml (Preparat 4), a resztę nanieść na kolumnę.
3. Prowadzić elucję 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; zbierając 3,5 ml frakcje przy szybkości wypływu 10 ml/godz.
4. W poszczególnych frakcjach oznaczyć spektrofotometrycznie białko przez pomiar absorbancji przy 280 nm i aktywność fosfatazową (rozdział 4.7.3.2).
5. Wykreślić profil elucji białka i aktywności fosfatazowej. Zebrać frakcje o najwyższej aktywności właściwej.

Materiały i odczynniki

- 0,1 M bufor octanowy o pH 3,6 z dodatkiem 3 mM disiarczanu (IV) potasu ($K_2S_2O_5$)
- etanol wymrożony
- 0,2 M oraz 50 mM bufor Tris-HCl o pH 7,5
- DEAE- celuloza
- Bio-Gel P-150

Bilans preparacji fosfatazy kwaśnej ze 100 g bulwy ziemniaka

PREPARAT	OBJĘTOŚĆ V [ml]	BIAŁKO				AKTYWNOŚĆ KWAŚNEJ FOSFATAZY						STOPIEŃ OCZYSZCZENIA	WYDAJNOŚĆ [%]
		rozcieńczenie	A ₂₈₀	mg/ml *	białko całkowite [mg]	objętość pobrana do testu enzymatycznego	ΔA ₄₁₀	μmole zwolnionego pNP	J/ml **	aktywność całkowita [J]	aktywność właściwa [J/mg]		
Preparat 1 (supernatant wyjściowy)		20 x				10 μl 20 μl 50 μl							
Preparat 2 (nanoszony na DEAE-celulozę)		3 x				10 μl							
Preparat 3 (szczytowe frakcje białek zaadsorbowanych na DEAE-celulozie)		bez rozcieńczenia				20–100 μl							

* Przyjmujemy, że średni współczynnik absorpcji właściwej tych białek $a_{280} = 1$, tzn. roztwór białka o stężeniu 1 mg/ml ma A_{280} równą 1.

** Jedna jednostka aktywności fosfatazowej (J) odpowiada takiej ilości enzymu, która zwalnia 1 μmol p-nitrofenolu w ciągu 1 minuty w temperaturze 37°C.

4.7.2. Identyfikacja aktywności fosfatazy kwaśnej w elektroforogramach

Zasada metody

W materiale biologicznym poddanym elektroforezie w żelu poliakryloamidowym w warunkach natywnych można wykryć aktywność fosfatazy kwaśnej. Obecny w żelu natywny enzym hydrolizuje fosforan α -naftolu. Powstały w reakcji α -naftol, w reakcji sprzęgania diazowego z solą Fast Blue B daje produkt o czerwono-brunatnym zabarwieniu. W analogiczny sposób w elektroforogramach można identyfikować aktywność fosfatazy zasadowej (rozdział 3.11.3.3).

Wersja A

Postępowanie

1. Przeprowadzić analizę Preparatu 3 uzyskanego w doświadczeniu 0 metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym opisanej w rozdziale 3.11.1.1, nanosząc na żel preparat o aktywności ok. 0,1 J (aktywność oznaczyć metodą opisaną w rozdziale 4.7.3.2A).
2. Żel inkubować 3 razy po 20 minut w 0,2 M buforze octanowym o pH 5,0 (warunki optymalne dla aktywności katalitycznej enzymu).
3. Żel inkubować w świeżo przygotowanym roztworze substratu w temperaturze 37°C do momentu pojawienia się czerwono-brunatnych pasm.
4. Reakcję zahamować przez przeniesienie żelu do 7% roztworu kwasu octowego.

Materiały i odczynniki

- α -naftylofosforan sodu
- Fast Blue B
- roztwór substratu: 1 mg α -naftylofosforanu sodu i 0,6 mg Fast Blue B rozpuścić w 1 ml 0,2 M buforu octanowego o pH 5,0; roztwór, przed użyciem przesączyć
- 0,2 M bufor octanowy o pH 5,0
- 7% kwas octowy

Wersja B

Postępowanie

1. Przygotować ekstrakty roślinne poprzez rozdrobnienie 10g wybranej tkanki roślinnej w zimnym buforze do homogenizacji (ok. 1-5ml/1g tkanki) oraz przesączenie i/lub odwirowanie (10 000×g, 4°C, 10min.).
2. Przeprowadzić analizę otrzymanych przesączów/supernatantów metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w układzie ciągłym opisanej w rozdziale 3.11.1.2, nanosząc na żel maksymalną objętość preparatów mieszczącą się w studzienkach. Na żel nanieść również próbę kontrolną – preparat fosfatazy kwaśnej z łubinu żółtego.
3. Żel inkubować 4 razy po 5-10 minut w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,2.
4. Żel inkubować w świeżo przygotowanym roztworze substratu, wcześniej ogrzanym do temperatury 37°C, do momentu pojawienia się czerwono-brunatnych pasm.
5. Udokumentować obraz elektroforetyczny.

Opracowanie wyników

1. Opisać sposób przygotowania ekstraktów roślinnych, podając m.in. najważniejsze wartości liczbowe.
2. Opisać warunki elektroforezy.
3. Na podstawie oznaczenia ilościowego (ćw. 4.7.3.2B), obliczyć, jaka liczba jednostek aktywności enzymatycznej została nałożona na żel w każdym preparacie.
4. Załączyć zdjęcie żelu elektroforetycznego wraz z opisem.
5. Opisać uzyskany obraz rozdzielanych preparatów.
6. Skonfrontować wyniki uzyskane w doświadczeniu ilościowym (ćw. 4.7.3.2B) i jakościowym.

Materiały i odczynniki:

- zimny bufor do homogenizacji: 50mM bufor octanowy, pH 5,2
- tarka, młyn, młynek, blender
- saszki bibułowe
- spolimeryzowany 7,5% żel poliakrylamidowy, pH 8,8.
- bufor do obciążenia próbek 5×stężony (0,3M Tris-HCl, pH 8,8, 50%o/o glicerol, 0,5mg/ml błękit bromofenolowy)
- Bufor elektrodowy 25mM Tris, 192mM Gly (pH 8,3)
- 0,1M bufor octanowy, pH 5,2
- 10%w/o $MgCl_2$
- Fast Blue B salt (chlorek di-o-anizydynotetrazoliny)
- α -naftylofosforan
- NaCl
- preparat fosfatazy kwaśnej z nasion łubinu żółtego o aktywności 10J/ml (próba kontrolna)

4.7.3. Oznaczanie aktywności fosfataz kwaśnych i zasadowych

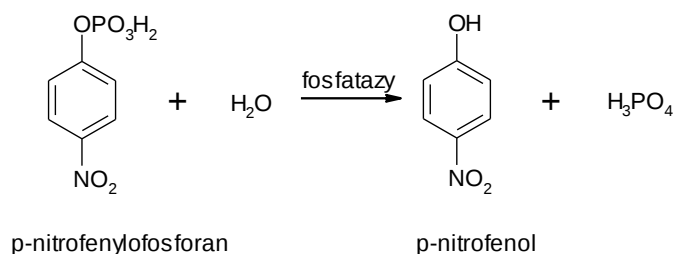
Aktywność fosfataz oznacza się zazwyczaj przy użyciu substratów syntetycznych takich jak p-nitrofenylofosforan, α - i β -glicerofosforan, fenylofosforan, oraz α - i β -naftylofosforan. Miarą aktywności enzymu jest ilość uwolnionego nieorganicznego fosforanu lub uwolnionej reszty organicznej estru fosforanowego.

4.7.3.1. Oznaczanie aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy krwi

Bessey O.A., Lowry D.H., Brock A. (1946) J. Biol. Chem. 164, 321–324.

Zasada metody

Fosfataza w środowisku zasadowym hydrolizuje fosforan p-nitrofenolu (pNPP) do wolnego fosforanu i p-nitrofenolu (pNP) (Rys. 4.18). pNP ma w środowisku silnie alkalicznym żółte zabarwienie i jego ilość oznacza się kolorymetrycznie przez pomiar absorbancji przy 410 nm.



Rys. 4.18. Reakcja hydrolizy fosforanu p-nitrofenolu katalizowana przez fosfatazy

Ilość p-nitrofenolu zwolnionego w czasie reakcji jest miarą aktywności enzymu. Za jednostkę aktywności fosfatazy zasadowej przyjmujemy taką jego ilość, która zwalnia 1 mmol p-nitrofenolu w ciągu 1 godziny w warunkach metody. 1 jednostka Bessey'a odpowiada ilości mmoli uwolnionego p-nitrofenolu przez enzym zawarty w 1 litrze surowicy, w ciągu 1 godziny inkubacji w warunkach metody.

Wykonanie krzywej standardowej dla p-nitrofenolu

1. 10 mM wzorcowy roztwór p-nitrofenolu (pNP) rozcieńczyć wodą 20 razy (uzyska się w ten sposób 0,5 mM standardowy roztwór pNP).
2. Do kolejnych probówek odmierzyć podane w tabeli ilości 0,5 mM roztworu pNP i uzupełnić wodą do 2 ml.

nr próby	pNP [ml]	H ₂ O [ml]	ilość μ moles pNP w próbce	A ₄₁₀
0 (próba ślepa)	—	2,0	—	—
1	0,2	1,8	0,1	
2	0,4	1,6	0,2	
3	0,6	1,4	0,3	
4	0,8	1,2	0,4	
5	1,0	1,0	0,5	

- Do prób dodać po 5 ml 0,1 M NaOH i dokładnie wymieszać.
- Odczytać absorbancję poszczególnych prób przy 410 nm wobec próby odczynnikowej.
- Z uzyskanych wyników wykreślić krzywą standardową (zależność A₄₁₀ od ilości μ moles pNP w próbce).

Wykonanie oznaczenia

- Przygotować:
 - ślepa próbę odczynnikową zawierającą 1 ml 0,1M buforu glicynowego o pH 10,4 z 1 mM MgCl₂ (bufor reakcyjny)
 - próby badane, zawierające 0,2 ml roztworów surowicy o różnym stopniu rozcieńczenia i 0,8 ml buforu reakcyjnego
 - próby kontrolne, zawierające 0,8 ml buforu reakcyjnego
 - roztwór substratu – 10 mM roztwór fosforanu p-nitrofenolu (pNPP)
- Wszystkie próby oraz roztwór substratu preinkubować 5 minut w bloku grzejmym lub łaźni wodnej o temperaturze 37°C.
- Rozpocząć reakcję enzymatyczną, dodając kolejno do wszystkich prób po 1 ml 10 mM pNPP.
- Dokładnie po 10 minutach reakcję przerwać przez dodanie 5 ml 0,1 M NaOH.
- Do prób kontrolnych dodać 0,2 ml roztworów surowicy.
- Odczytać A₄₁₀ prób badanych i kontrolnych wobec ślepej próby odczynnikowej.
- Od wartości A₄₁₀ prób badanych odjąć wartości uzyskane dla prób kontrolnych (jeśli wartości A₄₁₀ prób kontrolnych są bliskie zera, można wykonywanie tych prób pominąć).
- Z krzywej standardowej odczytać ilość pNP zwolnionego w czasie reakcji. Obliczyć aktywność fosfatazy zasadowej w jednostkach na 1 l surowicy (jednostki Bessey'a).

Materiały i odczynniki

- wzorcowy roztwór p-nitrofenolu – 10 mM wodny roztwór p-nitrofenolu (pNP): 139,1 mg/100 ml
- 10 mM roztwór p-nitrofenylofosforanu sodu (pNPP) w buforze reakcyjnym; roztwór przygotować na świeżo
- bufor reakcyjny: 0,1M bufor glicyna-NaOH o pH 10,4 z 1 mM MgCl₂; przechowywać w lodówce
- 0,1 M NaOH
- surowica wieprzowa lub bydlęca

4.7.3.2. Oznaczanie aktywności fosfatazy kwaśnej wobec fosforanu p-nitrofenolu metodą nieciągłą

Zasada metody

Enzym w środowisku kwaśnym hydrolizuje fosforan p-nitrofenolu (pNPP) do wolnego fosforanu i p-nitrofenolu (pNP), który po zalkalizowaniu próby przyjmuje żółte zabarwienie. Ilość p-nitrofenolu zwolnionego w reakcji mierzona przy 410 nm jest miarą aktywności enzymu.

Schemat reakcji hydrolizy pNPP został przedstawiony w poprzednim rozdziale (Rys. 4.18). Za jedną jednostkę aktywności fosfatazowej przyjęto taką ilość enzymu, która zwalnia 1 μmol p-nitrofenolu w ciągu 1 minuty w temperaturze 37°C.

Wersja A

Wykonanie krzywej standardowej dla p-nitrofenolu

1. 10 mM roztwór wzorcowy pNP rozcieńczyć wodą 20 razy (uzyska się w ten sposób 0,5 mM standardowy roztwór pNP).
2. Do kolejnych probówek odmierzyć podane w tabeli poniżej ilości 0,5 mM roztworu pNP i uzupełnić 0,1 M buforem octanowym o pH 5,1 do końcowej objętości 1 ml.

nr próby	pNP [ml]	bufor [ml]	ilość μmoli pNP w próbce	A_{410}
0 (próba ślepa)	–	1	–	–
1	0,1	0,9	0,05	
2	0,2	0,8	0,10	
3	0,3	0,7	0,15	
4	0,4	0,6	0,20	
5	0,5	0,5	0,25	

3. Do wszystkich prób dodać po 5 ml 0,1 M NaOH i dokładnie wymieszać.
4. Odczytać A_{410} poszczególnych prób wobec próby odczynnikowej.
5. Z uzyskanych wyników wykreślić krzywą standardową (zależność A_{410} od ilości μmoli pNP w próbce).

Wykonanie oznaczenia

1. Przygotować:
 - próby badane i kontrolne zawierające enzym w objętości 0,5 ml
Uwaga! W czasie oznaczania aktywności preparatów kwaśnej fosfatazy uzyskanych w doświadczeniu 0, pobrane objętości enzymu należy uzupełniać do końcowej objętości 0,5 ml 0,1 M buforem octanowym o pH 5,1
 - próbę odczynnikową zawierającą 0,5 ml 0,1 M buforu octanowego o pH 5,1
 - roztwór substratu: 10 mM pNPP w 0,1 M buf. octanowym o pH 5,1
2. Wszystkie próby oraz roztwór substratu preinkubować 5 minut w bloku grzejmym lub łaźni wodnej o temperaturze 37°C.
3. Rozpocząć reakcję enzymatyczną dodając kolejno do próby odczynnikowej i prób badanych po 0,5 ml substratu.
4. Dokładnie po 10 minutach reakcję przerwać przez dodanie 5 ml 0,1 M NaOH.
5. Do prób kontrolnych dodać najpierw 5 ml 0,1 M NaOH, a następnie 0,5 ml substratu.
6. Odczytać A_{410} prób badanych i kontrolnych wobec próby odczynnikowej.
7. Od wartości A_{410} prób badanych odjąć wartości uzyskane dla prób kontrolnych (jeśli wartości A_{410} prób kontrolnych są bliskie zera, można wykonywanie tych prób pominąć).
8. Z krzywej standardowej odczytać ilość pNP zwolnionego w czasie reakcji.

Materiały i odczynniki

- standardowy 10 mM roztwór p-nitrofenolu – pNP: 139,1 mg/100 ml H_2O
- roztwór substratu: 10 mM p-nitrofenylofosforan sodu (pNPP) w buforze reakcyjnym; roztwór przygotować na świeżo
- bufor reakcyjny: 0,1 M bufor octanowy o pH 5,1
- 0,1 M NaOH

Wersja B

Wykonanie krzywej standardowej dla p-nitrofenolu

1. Do kolejnych probówek odmierzyć podane w poniższej tabeli objętości roztworu pNP oraz 0,1M buforu octanowego, pH 5,2
2. Do wszystkich prób dodać po 0,125ml wody
3. Do wszystkich prób dodać po 0,5ml 0,25M NaOH i dokładnie wymieszać
4. Odczytać A_{410} poszczególnych prób wobec próby odczynnikowej (0,375ml buforu, 0,125ml wody i 0,5ml NaOH).
5. Z uzyskanych wyników wykreślić krzywą standardową (zależność A_{410} od ilości μ oli pNP w próbce), uwzględniając przecięcie w punkcie $x=0/y=0$.

nr próby	bufor [μ l]	pNP [μ l]
1	350	25
2	325	50
3	275	100
4	225	150
5	175	200
6	125	250

Materiały i odczynniki:

- 0,2mM roztwór pNP w 0,1M buforze octanowym o pH 5,2
- 0,1M bufor octanowy, pH 5,2
- 0,25M NaOH

Wykonanie oznaczenia

1. Próby przygotować poprzez odpipetowanie różnych objętości (10-50 μ l) badanego roztworu enzymu (w razie konieczności preparat odpowiednio rozcieńczyć) i uzupełnienie jego objętości do 375 μ l buforem reakcyjnym.
2. Przygotować próbę kontrolną zawierającą 375 μ l buforu reakcyjnego i 125 μ l roztworu pNPP.
3. Próby oraz roztwór substratu wstawić do bloku grzejnego lub łaźni wodnej o temperaturze 37°C i preinkubować przez ok. 5min.
4. W próbach badanych reakcję enzymatyczną rozpocząć przez dodanie 125 μ l roztworu pNPP, dokładnie wymieszać.
5. Reakcję prowadzić w temperaturze 37°C.
6. Po dokładnie 5 minutach reakcję enzymatyczną przerwać przez dodanie 0,5ml 0,25M NaOH, dokładnie wymieszać. NaOH dodać również do próby kontrolnej
6. Odczytać A_{410} poszczególnych prób wobec próby odczynnikowej (0,375ml buforu, 0,125ml wody i 0,5ml NaOH).
7. Od wyników uzyskanych dla prób badanych odjąć wartość uzyskaną dla próby kontrolnej.

Opracowanie wyników:

1. Wykreślić krzywą standardową dla pNP (zależność A_{410} od ilości μ oli pNP w próbce), uwzględniając przecięcie w punkcie $x=0/y=0$. Podać równanie prostej ($y=ax$) oraz współczynnik R-kwadrat.
2. Opisać niezmiennie warunki prowadzonych reakcji enzymatycznych w próbach badanych.
3. Przedstawić, w formie tabeli, skład poszczególnych prób badanych (rodzaj, objętość pobrana do oznaczenia i krotność rozcieńczenia preparatu) oraz uzyskane wyniki (A_{410} , odczytana z krzywej ilość p-NP, obliczona aktywność fosfatazowa [J/ml])
4. Przedstawić, w formie tabeli, następujące wartości: aktywność [J/ml], aktywność całkowita oraz aktywność fosfatazy kwaśnej w przeliczeniu na gram tkanki dla badanych preparatów.

Materiały i odczynniki:

- ekstrakty przygotowane wg ćw. 4.7.2B

- 10mM roztwór p-nitrofenylofosforanu sodu – pNPP w wodzie
- bufor do reakcji: 0,1M bufor octanowy, pH 5,2
- 0,25M NaOH
- łaźnia lub blok grzejny ustawione na 37°C

4.7.3.3. Przyrost ilości produktu w czasie reakcji katalizowanej przez fosfatę kwasną

Zasadę metody opisano szczegółowo w rozdziale 4.7.3.1 oraz 4.7.3.2.

Postępowanie

Przygotowanie roztworu kwaśnej fosfatazy

Kawałek ziemniaka (umytego i obranego) zetrzeć na tarce i dodać do niego równą objętość buforu A, wymieszać bagietką i całość przesączyć na lejku przez karbowany sącze. Zebrać przesącz.

Wykonanie oznaczenia

1. Przygotować próby reakcyjne: do pięciu probówek (4 próby badane i 1 próba kontrolna) odmierzyć po 0,5 ml roztworu enzymu (uzyskanego przesączu).
2. Przygotować roztwór substratu: 10 mM pNPP w 0,1 M buf. octanowym o pH 5,1.
3. Rozpocząć reakcję enzymatyczną dodając kolejno do prób badanych po 0,5 ml substratu. Całość wymieszać. Zanotować czas. Reakcję prowadzić w temperaturze pokojowej.
4. Reakcję przerwać dodając po 5 ml 0,1 M NaOH:
 - a) Do probówki nr 1 – po 2 minutach
 - b) Do probówki nr 2 – po 4 minutach
 - c) Do probówki nr 3 – po 6 minutach
 - d) Do probówki nr 4 – po 8 minutach
- e) Do próby kontrolnej dodać najpierw 5 ml 0,1 M NaOH, a następnie 0,5 ml roztworu substratu.
5. Odczytać wartość A_{410} prób badanych wobec próby kontrolnej. Z krzywej standardowej (patrz rozdział 0A) odczytać ilość uwolnionego pNP.
6. Wykreślić zależność ilości uwolnionego produktu (pNP) od czasu reakcji.

Materiały i odczynniki

- bufor A: 0,1 M bufor octanowy o pH 3,6, zawierający 3 mM disiarczan (IV) potasu $K_2S_2O_5$ (pirosiarczyny potasu)
- bufor reakcyjny: 0,1 M bufor octanowy o pH 5,1
- roztwór substratu: 10 mM p-nitrofenylofosforan sodu (pNPP) w buforze reakcyjnym; roztwór przygotować na świeżo
- 0,1 M NaOH

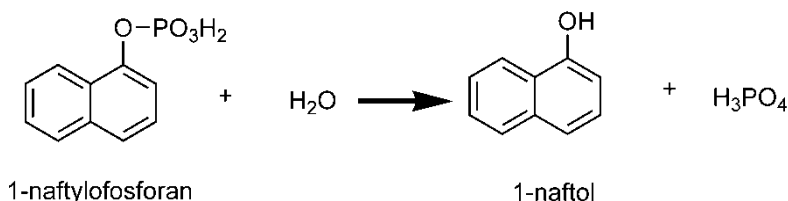
4.7.3.4. Oznaczanie aktywności fosfatazy kwaśnej wobec 1-naftylofosforanu metodą ciągłą

Luchter-Wasyłewska E. (1997) Acta Biochim. Polon. 44, 853–859.

Zasada metody

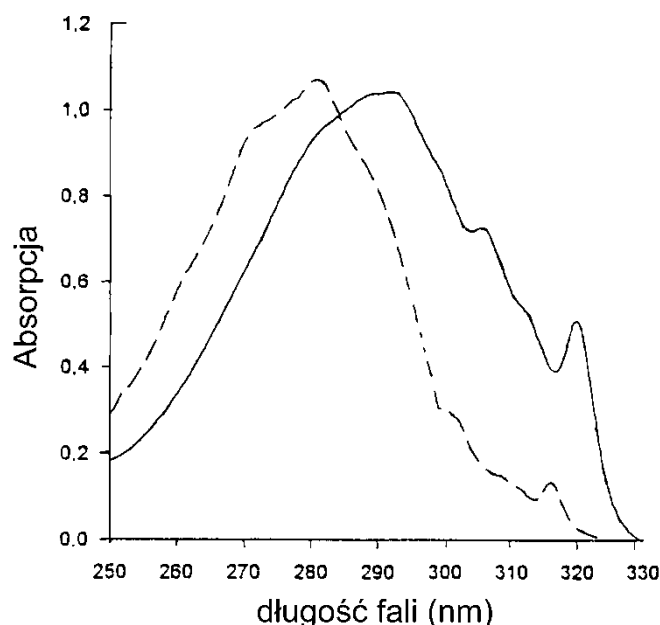
W testach oznaczania aktywności fosfatazy kwaśnej stosuje się różne monoestry fosforanowe. Standardową metodą oznaczania aktywności tego enzymu jest metoda kolorymetryczna, z użyciem pNPP jako substratu (rozdział 4.7.3.2), w której wykorzystuje się absorbancję produktu (pNP) w środowisku zasadowym. Jest to przykład metody nieciągłej oznaczania aktywności enzymu, gdzie pomiaru ilości produktu dokonuje się po zahamowaniu reakcji enzymatycznej. Znanych jest także kilka metod spektrofotometrycznych oraz fluorometrycznych ciągłego pomiaru aktywności fosfatazy kwaśnej, polegających na pomiarze przyrostu stężenia produktu w czasie trwania reakcji enzymatycznej. Wykorzystuje się w nich takie substraty jak: fenylfosforan, o-karboksyfenylfosforan, fosfotyrozynę, 2,6-dichloro-4-nitrofenylfosforan oraz 1-naftylofosforan.

W eksperymencie przedstawionym poniżej wykorzystano 1-naftylofosforan, hydrolizowany przez kwaśną fosfatazę zgodnie z reakcją przedstawioną na Rys. 4.19.



Rys. 4.19. Reakcja hydrolizy 1-naftylofosforanu katalizowana przez kwaśną fosfatazę

Metoda oznaczania aktywności enzymu wobec 1-naftylofosforanu opiera się na pomiarze zmian A_{320} w czasie trwania reakcji enzymatycznej, wynikających z przyrostu stężenia 1-naftolu (produkt reakcji). Pomiar ten jest możliwy dzięki dużej różnicy pomiędzy współczynnikami absorpcji substratu i produktu przy tej długości fali (patrz widmo absorpcyjne 1-naftylofosforanu i 1-naftolu, (Rys. 4.20)).



Rys. 4.20. Widma absorpcyjne 0,2 mM 1-naftolu (—) oraz 0,2 mM 1-naftylofosforanu (---) w 50 mM buforze octanowym o pH 4,5 wg Luchter-Wasylewska E, 1997

Postępowanie

1. Przygotować spektrofotometr do pomiaru przy długości fali 320 nm.
2. Do 1,9 ml roztworu substratu dodać enzym w objętości 0,1 ml (próbę enzymu rozcieńczyć tak, aby zawierała 0,1–0,2 J enzymu, wg standardowego oznaczenia wobec pNPP – patrz rozdział 4.7.3.2).
3. Mieszaninę reakcyjną szybko wymieszać, przenieść do kuwety, zanotować wyjściową absorbancję A_{320} . Reakcję prowadzić w temp. pokojowej przez 5–10 minut, odczytując zmiany A_{320} co 30 sekund.
4. Dodatkowo przeprowadzić pomiary dla próby odczynnikowej oraz dwóch prób kontrolnych:
 - próba odczynnikowa (E^-S^-): 2 ml 0,1 M buforu octanowego
 - próba kontrolna dla substratu w nieobecności enzymu (E^-S^+): 1,9 ml substratu + 0,1 ml buforu octanowego
 - próba kontrolna dla enzymu w nieobecności substratu (E^+S^-): 1,9 ml buforu octanowego + 0,1 ml roztworu enzymu

5. Na podstawie zmian wartości absorbancji w jednostce czasu ($\Delta A_{320}/\text{min}$) obliczyć aktywność enzymu w J/ml. Molowy współczynnik absorpcji dla 1-naftolu w zakresie pH 1,0–8,2 wynosi: $\epsilon_{320}=2\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
6. Do końcowych obliczeń wykorzystać wartość netto $\Delta A_{320}/\text{min}$, uzyskaną w następujący sposób:
 - obliczyć skorygowane wartości $\Delta A_{320}/\text{min}$ dla mieszaniny reakcyjnej oraz dla prób kontrolnych: od $\Delta A_{320}/\text{min}$ mieszaniny reakcyjnej oraz od $\Delta A_{320}/\text{min}$ prób kontrolnych odjąć $\Delta A_{320}/\text{min}$ próby ślepej
 - od skorygowanej wartości $\Delta A_{320}/\text{min}$ mieszaniny reakcyjnej odjąć sumę skorygowanych wartości $\Delta A_{320}/\text{min}$ uzyskanych dla prób kontrolnych.

Materiały i odczynniki

- substrat: 1,5 mM roztwór 1-naftylofosforanu w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1
- roztwór enzymu w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1 (wymagane stężenie enzymu: 1-2 J/ml wobec pNPP – patrz rozdział 4.7.3.2)

4.7.4. Fosfataza kwaśna – kinetyka enzymatyczna

4.7.4.1. Przygotowanie roztworu enzymu

Postępowanie

1. W preparacie kwaśnej fosfatazy uzyskanym w doświadczeniu 4.7.1 oznaczyć aktywność enzymu i rozcieńczyć roztwór wyjściowy 0,1 M buforem octanowym o pH 5,1 w taki sposób, aby otrzymać roztwór podstawowy enzymu o żądanej aktywności: 0,05 J/ml lub 0,1 J/ml.
2. W przypadku preparatu liofilizowanego odważyć około 200 mg preparatu fosfatazy kwaśnej i rozpuścić w 20 ml 0,1 M buforu octanowego o pH 5,1. Dalej postępować jak w punkcie 1.

Uwaga! We wskazanych doświadczeniach należy używać wodnego roztworu enzymu

4.7.4.2. Wpływ stężenia fosfatazy kwaśnej na szybkość reakcji enzymatycznej

Postępowanie

1. Do dwóch serii probówek (seria badana i kontrolna) odmierzyć następujące ilości podstawowego roztworu enzymu (o aktywności 0,05 J/ml): 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ml i uzupełnić 0,1 M buforem octanowym o pH 5,1 do końcowej objętości 0,5 ml.
2. Próbę odczynnikową przygotować dodając w miejsce roztworu enzymu 0,5 ml buforu octanowego o pH 5,1.
3. Próby badane i kontrolne oraz roztwór substratu – 10 mM pNPP w 0,1 M buforze octanowym pH 5,1 – wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C i preinkubować przez ok. 5 minut.
4. Do serii prób badanych dodać po 0,5 ml substratu ogrzanego do 37°C.
5. Dokładnie po 10 minutach przerwać reakcję enzymatyczną przez dodanie 5 ml 0,1 M NaOH.
6. W serii prób kontrolnych dodać najpierw 5 ml 0,1 M NaOH, a następnie 0,5 ml roztworu substratu.
7. Oznaczyć ilość zwolnionego pNP przez pomiar A_{410} . Wypełnić tabelkę i sporządzić wykres zależności szybkości reakcji od stężenia enzymu. Szybkość reakcji wyrazić poprzez ilość powstałego produktu (μmol pNP) w ciągu minuty katalizowanej reakcji w warunkach testu.

nr próby	stężenie enzymu [J/ml]	A ₄₁₀	ilość zwolnionego pNP [μmol]	v [μmol/min]
1				
2				
3				
4				
5				

Materiały i odczynniki

- podstawowy roztwór fosfatazy kwaśnej o aktywności 0,05 J/ml (patrz rozdział 0)
- roztwór substratu: 10 mM p-nitrofenylofosforan (pNPP) w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1
- 0,1 M bufor octanowy o pH 5,1
- 0,1 M NaOH

4.7.4.3. Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji katalizowanej przez fosfatazę kwaśną

Postępowanie

1. Przygotować roztwór enzymu o aktywności **0,05 J/ml**
2. 10 mM pNPP (podstawowy roztwór substratu) rozcieńczyć 0,1 M buforem octanowym o pH 5,1 w taki sposób, aby uzyskać roztwory o stężeniu 5 mM i 1 mM.
3. Do dwóch serii probówek (seria badana i kontrolna) odmierzyć podane w tabeli objętości kolejnych roztworów substratów oraz buforu octanowego celem uzupełnienia do końcowej objętości 0,5 ml.

nr próby	końcowe stężenie substratu	wyjściowy roztwór substratu		0,1 M bufor octanowy, pH 5,1
		1 mM	5 mM	
0 (próba ślepa)		–	–	0,50 ml
1	0,02 mM	0,02 ml		0,48 ml
2	0,05 mM	0,05 ml	–	0,45 ml
3	0,10 mM	0,10 ml	–	0,40 ml
4	0,20 mM	0,20 ml	–	0,30 ml
5	0,40 mM	0,40 ml	–	0,10 ml
6	0,75 mM		0,15 ml	0,35 ml
7	1,00 mM		0,20 ml	0,30 ml
8	2,00 mM	–	0,40 ml	0,10 ml

4. Próby badane i kontrolne oraz roztwór enzymu o aktywności 0,05 J/ml wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C i preinkubować przez ok. 5 minut.
5. Do serii prób badanych dodać 0,5 ml roztworu ogrzanego enzymu.
6. Dokładnie po 10 minutach reakcję przerwać przez dodanie 5 ml 0,1 M NaOH.
7. Do serii prób kontrolnych dodać najpierw 0,1 M NaOH, a następnie 0,5 ml roztworu enzymu.
8. W próbach oznaczyć ilość zwolnionego pNP. Sporządzić wykres zależności szybkości reakcji (ilość μmoli pNP zwolnionego w ciągu 1 minuty) od stężenia substratu wyrażonego w molach oraz wykres zależności 1/v od 1/[S]. Wyznaczyć stałą Michaelisa (K_M) oraz szybkość maksymalną (V_{max}).

nr próby	[S] [M]	1/[S] [M ⁻¹]	A ₄₁₀	v [μmol/min]	1/v [min/μmol]
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Materiały i odczynniki

- roztwór fosfatazy kwaśnej o aktywności 0,05 J/ml (patrz rozdział 0)
- 10 mM p-nitrofenylofosforan (pNPP) w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1
- 0,1 M bufor octanowy o pH 5,1
- 0,1 M NaOH

4.7.4.4. Hamowanie fosfatazy kwaśnej jonami miedzi, jonami fosforanowymi i winianem sodu

Postępowanie

1. Przygotować roztwór enzymu o aktywności **0,1 J/ml**.
2. Przygotować dwie serie próbek (seria badana i kontrolna) zawierające identyczne jak w doświadczeniu 4.7.4.3 stężenia pNPP w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1.
3. Do wszystkich prób odmierzyć po 0,25 ml odpowiedniego roztworu inhibitora.
4. Próby badane i kontrolne oraz roztwór enzymu o aktywności 0,1 J/ml umieścić w łaźni wodnej o temp. 37°C i preinkubować około 5 minut.
5. Do serii próbek badanych dodać po 0,25 ml ogrzanego roztworu enzymu.
6. Dokładnie po 10 minutach reakcję przerwać przez dodanie 5 ml 0,1 M NaOH.
7. Do serii prób kontrolnych dodać najpierw 0,1 M NaOH, a następnie roztwór enzymu.
8. W próbach oznaczyć ilość zwolnionego pNP przez pomiar A₄₁₀, wypełnić tabelę. Wykreślić zależność 1/v od 1/[S]. Wyznaczyć K_{Mi} i V_{max,i}. Na podstawie porównania parametrów K_M i K_{Mi} oraz V_{max} i V_{max,i} określić typ hamowania.
9. Dodatkowo wyznaczyć K_M i K_{Mi} oraz V_{max} i V_{max,i} metodami Hanesa-Woolfa i Woolf-Augustinsson-Hofstee (patrz rozdział 4.4.5.1). Porównać uzyskane wyniki.

Uwaga! Porównanie wartości V_{max} i V_{max,i} jest możliwe tylko wtedy, gdy doświadczenia 4.7.4.3 i 4.7.4.4 zostaną przeprowadzone równolegle, z użyciem tego samego roztworu enzymu.

nr próby	[S] [M]	1/[S] [M ⁻¹]	A ₄₁₀	v [μmol/min]	1/v [min/μmol]
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Materiały i odczynniki

- roztwór fosfatazy kwaśnej o aktywności 0,1 J/ml (patrz rozdział 4.7.4.1)
- 10 mM p-nitrofenylofosforan (pNPP) w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1
- roztwory inhibitorów: 2 mM roztwór CuSO₄, 1 mM roztwór fosforanu sodu, 20 mM roztwór winianu sodu
- 0,1 M bufor octanowy o pH 5,1
- 0,1 M NaOH

4.7.4.5. Wpływ pH na aktywność fosfatazy kwaśnej

Postępowanie

1. Przygotować wodny roztwór enzymu o aktywności **0,1 J/ml**.
2. Do dwóch serii probówek (seria badana i kontrolna) odmierzyć po 0,5 ml 0,2 M buforu octanowego o wartościach pH podanych w tabeli poniżej, a następnie po 0,25 ml roztworu substratu (20 mM wodny roztwór pNPP).
3. Próby badane i kontrolne oraz roztwór enzymu o aktywności 0,1 J/ml umieścić w łaźni wodnej o temp. 37°C i preinkubować około 5 minut.
4. Do serii prób badanych dodać 0,25 ml ogrzanego roztworu enzymu.
5. Dokładnie po 10 minutach reakcję przerwać przez dodanie 5 ml 0,1 M NaOH.
6. Do serii prób kontrolnych dodać najpierw 0,1 M NaOH, a następnie 0,25 ml roztworu enzymu.
7. Odczytać A_{410} prób badanych i kontrolnych wobec próby odczynnikowej zawierającej 1 ml buforu octanowego i 5 ml 0,1 M NaOH.
7. Z krzywej standardowej odczytać ilość zwolnionego pNP i sporządzić wykres zależności szybkości reakcji od pH.

nr próby	pH	A_{410}	ilość zwolnionego pNP [μmol]	v [$\mu\text{mol/min}$]
1	3,6			
2	4,0			
3	4,4			
4	4,8			
5	5,0			
6	5,2			
7	5,6			
8	6,0			

Materiały i odczynniki

- wodny roztwór fosfatazy kwaśnej o aktywności 0,1 J/ml (patrz rozdział 4.7.4.1)
- 20 mM roztwór wodny p-nitrofenylofosforanu (pNPP)
- 0,2 M bufor octanowy o następujących wartościach pH: 3,6, 4,0, 4,4, 4,8, 5,0, 5,2, 5,6, 6,0
- 0,1 M NaOH

4.7.4.6. Wpływ temperatury na aktywność fosfatazy kwaśnej

Postępowanie

1. Przygotować dwie serie 6 probówek.
2. Do obu serii probówek (próby badane i kontrolne) odmierzyć po 0,5 ml roztworu enzymu o aktywności **0,05 J/ml**.
3. Poszczególne pary prób badanych i kontrolnych oraz porcje substratu preinkubować przez ok. 5 minut w następujących temperaturach: ok. 0°C (łaźnia lodowa), ok. 10°C (lodówka), 25°C, 35°C, 45°C i 55°C.
4. Do serii prób badanych dodać po 0,5 ml 10 mM pNPP w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1.
5. Dokładnie po 10 minutach do prób badanych i kontrolnych dodać po 5 ml 0,1 M NaOH. Do prób kontrolnych dodać po 0,5 ml roztworu substratu, preinkubowanego w danej temperaturze reakcji.
6. Oznaczyć ilość zwolnionego pNP w próbach przez pomiar A_{410} i wykreślić zależność szybkości reakcji enzymatycznej od temperatury.

7. Dla przedziału temperatur 25–35°C wyznaczyć współczynnik temperaturowy Q_{10} (patrz rozdział 4.4.3).

Materiały i odczynniki

- roztwór fosfatazy kwaśnej o aktywności 0,05 J/ml (patrz rozdział 4.7.4.1)
- 10 mM p-nitrofenylofosforan (pNPP) w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1
- 0,1 M bufor octanowy o pH 5,1
- 0,1 M NaOH

4.7.4.7. Określenie termostabilności fosfatazy kwaśnej

Postępowanie

1. Przygotować dwie serie 6 probówek. Do obu serii probówek (próby badane i kontrolne) odmierzyć po 0,5 ml roztworu enzymu o aktywności **0,05 J/ml**. Do próby odczynnikowej dodać 0,5 ml buforu reakcyjnego.
2. Poszczególne pary prób badanych i kontrolnych inkubować przez 30 minut w następujących temperaturach: ok. 0°C (łaznia lodowa), ok. 10°C (lodówka), 25°C, 35°C, 45°C, 55°C (łaznia wodna).
3. Po zakończeniu inkubacji wszystkie próby szybko doprowadzić do jednakowej temperatury (ogrzać/schłodzić w strumieniu bieżącej wody).
4. Przeprowadzić reakcję enzymatyczną we wszystkich próbach w temperaturze 37°C. Przed rozpoczęciem reakcji poszczególne próby i porcję substratu preinkubować w temp. 37°C przez ok. 5 minut.
5. Reakcję enzymatyczną rozpocząć przez dodanie do prób badanych i do próby odczynnikowej po 0,5 ml roztworu substratu.
6. Dokładnie po 10 minutach do prób badanych i kontrolnych dodać po 5 ml 0,1 M NaOH. Do prób kontrolnych dodać następnie po 0,5 ml roztworu substratu.
7. W próbach oznaczyć ilość zwolnionego pNP przez pomiar A_{410} i wykreślić zależność aktywności enzymu od temperatury inkubacji.

Materiały i odczynniki

- roztwór fosfatazy kwaśnej o aktywności 0,05 J/ml (patrz rozdział 4.7.4.1)
- 10 mM p-nitrofenylofosforan (pNPP) w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,1
- 0,1 M bufor octanowy o pH 5,1
- 0,1 M NaOH

4.8. FOSFATAZA ZASADOWA – KINETYKA ENZYMATYCZNA

Zasada oznaczenia

Enzym w środowisku zasadowym hydrolizuje pNPP (syntetyczny analog substratu) do wolnego fosforanu i p-nitrofenolu (pNP). pNP w warunkach alkaicznych tworzy anion p-nitrofenolanowy o żółtym zabarwieniu. Wzrost natężenia barwy w czasie trwania reakcji jest mierzony przy 405nm i jest miarą ilości zwalnianego pNP. Szybkość V_0 reakcji jest wyznaczana na podstawie $\Delta A_{405}/\text{min}$ dla początkowego liniowego fragmentu wykresu obrazującego postęp reakcji.

Postępowanie

1. Przygotować 100ml 0,5M buforu Tris/HCl, pH 9,0 z 5mM MgCl_2 .
2. Włączyć spektrofotometr i wybrać program pomiarów kinetycznych przy 405nm (czas pomiaru 2 min., interwały pomiaru 20 sek.)
3. Do kuwety odmierzyć odpowiednią objętość buforu do reakcji i substratu (wg tabeli poniżej), przykryć Parafilmem i wymieszać poprzez 3-4 krotnie odwrócenie, umieścić w spektrofotometrze i „wyzerować”.

nr próby	bufor do reakcji [ml]	1,35mM pNPP [ml]
1	2,25	0,15
2	2,20	0,20
3	2,10	0,30
4	2,00	0,40
5	1,90	0,50
6	1,40	1,00

4. Reakcję rozpocząć przez dodanie roztworu enzymu (0,1ml), mieszaninę szybko zamieszać i natychmiast rozpocząć pomiar A_{405} .
5. Wartości A_{405} odnotowywać co 20 sekund.

Opracowanie wyników

1. Opisać niezmiennie warunki prowadzonych reakcji.
2. Przedstawić w jednej tabeli wyniki A_{405} dla wszystkich prób badanych w poszczególnych punktach czasowych.
3. Przedstawić graficznie zmiany A_{405} (ΔA_{405}) w funkcji czasu (na jednym wykresie dla wszystkich prób) z zaznaczeniem fragmentów, które wybrano dla wyznaczenia $\Delta A_{405}/\text{min}$.
4. Obliczyć przyrost stężenia produktu reakcji ($\Delta c/\text{min}$), korzystając z molowego współczynnika pNP ($\epsilon=18500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a następnie szybkość reakcji (v_0) wyrażoną w $\mu\text{mol}/\text{min}$
5. Przedstawić, w formie tabeli, warunki prowadzenia reakcji w poszczególnych próbach badanych (stężenie substratu, przy którym wykonano oznaczenia $[S]$ i $1/[S]$) oraz uzyskane wyniki ($\Delta A_{405}/\text{min}$, $\Delta c/\text{min}$, v_0 i $1/v_0$)
6. Ciąg dalszy: patrz *Opracowanie wyników* w ćw. 4.8.1

Materiały i odczynniki

- 1M bufor Tris-HCl, pH 9,0
- 50mM MgCl_2
- Fosfataza zasadowa (phosphatase, alkaline from bovine intestinal mucosa) 0,5U/ml w 0,5M buforze Tris/HCl, pH 9,0
- 1,35mM pNPP w buforze do reakcji
- Parafilm

4.8.1. Hamowanie fosfatazy zasadowej przez NaH_2PO_4 i L-Phe

Postępowanie

Oznaczenia wykonać jak w ćwiczeniu 4.7.5, odmierzając do kuwety o 0,1ml buforu mniej, a uzupełniając tę objętość jednym z inhibitorów.

Opracowanie wyników:

1. Wyniki opracować analogicznie do ćwiczenia 4.7.5
2. Na jednym wykresie przedstawić krzywe wysycenia enzymu substratem dla reakcji bez i w obecności inhibitorów
3. Graficznie (metodą Lineweavera-Burka, patrz rozdział 4.4.1) wyznaczyć parametry V_{max} i K_m dla reakcji bez i z inhibitorami: wszystkie proste przedstawić na jednym wykresie, odpowiednio prognozować „do tyłu” (aby widoczne było przecięcie z osią x), podać równania prostych ($y=ax$) oraz współczynniki R-kwadrat.
4. W jednej tabeli zebrać (obliczone na podstawie równań prostych) parametry V_{max} i K_m (dla reakcji bez i z inhibitorami) oraz k_{kat}^* (tylko dla reakcji bez inhibitora).
5. Określić typ inhibicji fosfatazy zasadowej przez NaH_2PO_4 , L-Phe

* aktywność roztworu fosfatazy zasadowej dodawanego do reakcji 0,5 U/ml

- * objętość roztworu fosfatazy zasadowej dodawanego do reakcji 0,1ml
- * aktywność właściwa w roztw. fosfatazy zasadowej 10 U/mg
- * masa molowa fosfatazy zasadowej 140 kDa

Materiały i odczynniki

- Bufor do reakcji (przygotowany wg ćw. 4.7.5)
- Fosfataza zasadowa (phosphatase, alkaline from bovine intestinal mucosa) 0,5U/ml w 0,5M buforze Tris/HCl, pH 9,0
- 1,35mM pNPP w buforze do reakcji
- 5mM NaH₂PO₄ w buforze do reakcji
- 50mM L-Phe w buforze do reakcji
- Parafilm

4.8.2. Jony Mg²⁺ jako aktywator fosfatazy zasadowej.

Postępowanie

1. Włączyć spektrofotometr i wybrać program pomiarów kinetycznych przy 405nm (czas pomiaru 2 min., interwały pomiaru 20 sek.)
2. Do kuwety odmierzyć odpowiednią objętość buforu, 50mM MgCl₂, wody oraz substratu (wg tabeli poniżej), przykryć Parafilmem i wymieszać poprzez 3-4 krotnie odwrócenie, umieścić w spektrofotometrze i „wyzerować”.

nr próby	1M bufor Tris-HCl, pH 8,0 [ml]	50mM MgCl ₂ [μl]	H ₂ O [μl]	1,35mM pNPP [ml]
1	1,2	—	700	0,5
2	1,2	26	674	0,5
3	1,2	52	648	0,5
4	1,2	104	596	0,5
5	1,2	156	544	0,5
6	1,2	260	440	0,5

3. Reakcję rozpocząć przez dodanie roztworu enzymu (0,1ml), mieszaninę szybko zamieszać i natychmiast rozpocząć pomiar A₄₀₅.
4. Wartości A₄₀₅ odnotowywać co 20 sekund.

Opracowanie wyników

1. Opisać niezmiennie warunki prowadzonych reakcji.
2. Przedstawić w jednej tabeli wyniki A₄₀₅ dla wszystkich prób badanych w poszczególnych punktach czasowych.
3. Przedstawić graficznie zmiany A₄₀₅ (ΔA₄₀₅) w funkcji czasu (na jednym wykresie dla wszystkich prób) z zaznaczeniem fragmentów, które wybrano dla wyznaczenia ΔA₄₀₅/min.
4. obliczyć przyrost stężenia produktu reakcji (Δc/min), korzystając z molowego współczynnika pNP (ε=18500M⁻¹cm⁻¹), a następnie szybkość reakcji (v₀) wyrażoną w μmol/min i % szybkości reakcji, przyjmując szybkość w próbie nr 1 jako 100%.
5. Przedstawić, w formie tabeli, warunki prowadzenia reakcji w poszczególnych próbach badanych (stężenie MgCl₂, przy którym wykonano oznaczenia) oraz uzyskane wyniki (ΔA₄₀₅/min., Δc/min, v₀ i %v₀)
6. Sporządzić wykres kolumnowy % szybkości reakcji w funkcji stężenia MgCl₂.

Materiały i odczynniki

- 1M bufor Tris-HCl, pH 8,0
- 50mM MgCl₂

- Fosfataza zasadowa (phosphatase, alkaline from bovine intestinal mucosa) 0,5U/ml w 0,5M buforze Tris/HCl, pH 9,0
- 1,35mM pNPP w wodzie
- Parafilm

4.9. AMYLAZY

Amylasy to enzymy hydrolizujące wiązanie α -1,4-glikozydowe w takich wielocukrach jak skrobia czy glikogen. Naturalnie występują trzy rodzaje amylaz różniących się miejscem działania i produktami reakcji.

α -amylazy (EC 3.2.1.1) są endoglikozydazami, hydrolizują wiązania α -1,4-glikozydowe położone wewnątrz cząsteczki wielocukru. Pierwszym produktem hydrolizy są erytrodekstryny dające z jodem czerwono-fioletowe zabarwienie. Następnie powstają niskie dekstryny (6-7 cząsteczek glukozy), a końcowym produktem reakcji jest maltoza.

α -amylazy występują zarówno u zwierząt jak i u roślin. U człowieka najwięcej α -amylazy występuje w ślinie, soku trzustkowym, mniej w krwi i w moczu. Aktywatorami, tych enzymów są jony chlorkowe.

β -amylazy (EC 3.2.1.2) są egzoglikozydazami występującymi u roślin, nie wykazano ich obecności u zwierząt. Produktem hydrolizy wielocukru przez β -amylazy są cząsteczki β -maltozy, odcinane od nieredukującego końca łańcucha polisacharydowego. W wyniku hydrolizy wiązań α -1,4-glikozydowych przez β -amylazy zmienia się konfiguracja przy C₁ glukozy z konfiguracji α na konfigurację β , stąd nazwa tych enzymów.

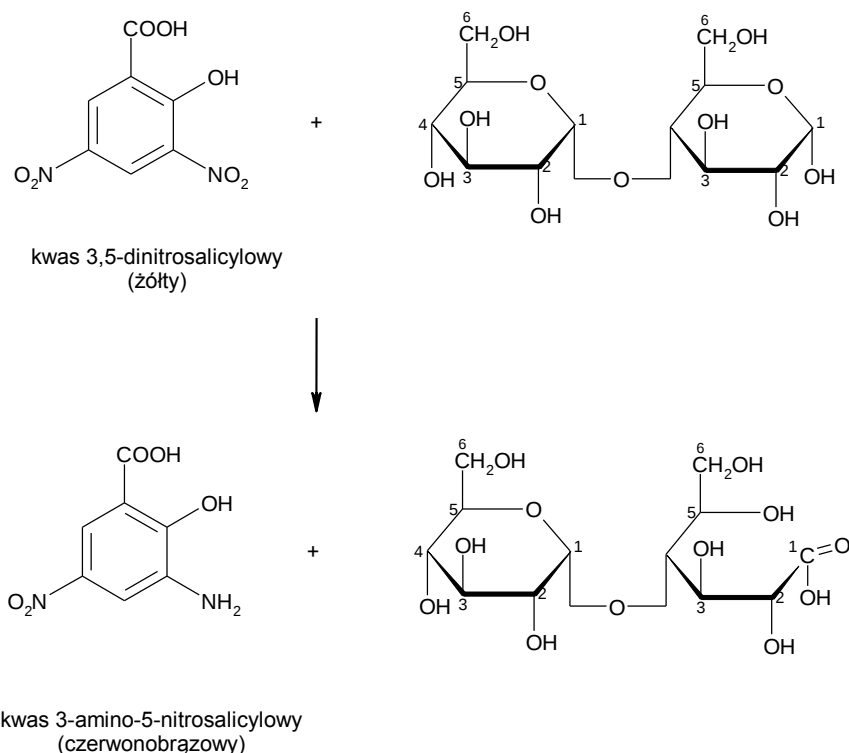
Glukoamylazy (γ -amylazy, EC 3.2.1.3) występują u roślin, zwierząt i bakterii. Są typowymi egzoglikozydazami. Produktem hydrolizy wielocukru przez te enzymy są cząsteczki glukozy usuwane kolejno przez enzym od strony nieredukującego końca substratu. Hydrolizują nie tylko wiązania α -1,4-glikozydowe, ale także α -1,6-glikozydowe. U człowieka najwyższą aktywność tego enzymu wykazano w trzustce i błonie śluzowej jelita.

4.9.1. Oznaczanie aktywności α -amylazy ślinowej metodą Bernfelda

Bernfeld P. (1955) *Methods in Enzymology* (Colowick S.P., Kaplan N.O. red), Acad. Press, New York, 149-158.

Zasada metody

W wyniku hydrolizy wielocukru przez amylazy powstają produkty posiadające właściwości redukujące. Przedstawiona poniżej metoda oznaczania aktywności α -amylazy opiera się na utlenianiu kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS) grup redukujących tych produktów (Rys. 4.21). Powstały barwny produkt: kwas 3-amino-5-nitrosalicylowy oznacza się kolorymetrycznie przy długości fali 530 nm.



Rys. 4.21. Reakcja utleniania grup redukujących cukru przez kwas 3,5-dinitrosalicylowy (DNS)

Postępowanie

1. Ślinę rozcieńczoną 500 – 1000 razy roztworem 0,9% NaCl oraz 0,5% roztwór skrobi ogrzać do temp. 30°C.
2. Do 1 ml roztworu skrobi dodać 1 ml rozcieńczonej śliny. Próby inkubować 15 minut w temp. 30°C.
3. Reakcję enzymatyczną przerwać przez dodanie 2 ml odczynnika dinitrosalicylowego.
4. Probówki przenieść do bloku grzejnego ustawionego na 100°C na 5 minut, po czym schłodzić.
5. Równolegle wykonać próbę kontrolną, w której do roztworu skrobi najpierw dodać odczynnik DNS, a po ogrzaniu we wrzącej łaźni wodnej – 1 ml rozcieńczonej śliny.
5. Do wszystkich prób dodać po 6 ml wody i odczytać A_{530} wobec wody.
6. Obliczyć aktywność α -amylazy, wyrażoną w J/ml nierozcieńczonej śliny. Za jedną jednostkę aktywności amylazy przyjąć taką ilość enzymu, która w warunkach metody powoduje przyrost $\Delta A_{530} = 0,05$.
7. Jeżeli wartość ΔA_{530} przekracza 0,7 powtórzyć oznaczenie biorąc do reakcji mniej enzymu.

Uwaga! Jako roztworu enzymu można użyć odpowiednio rozcieńczonej śliny, soku trzustkowego, surowicy, moczu, ekstraktu z suchych lub z kiełkujących nasion zbóż. W przypadku niskich aktywności wydłużyć czas inkubacji do 30 minut.

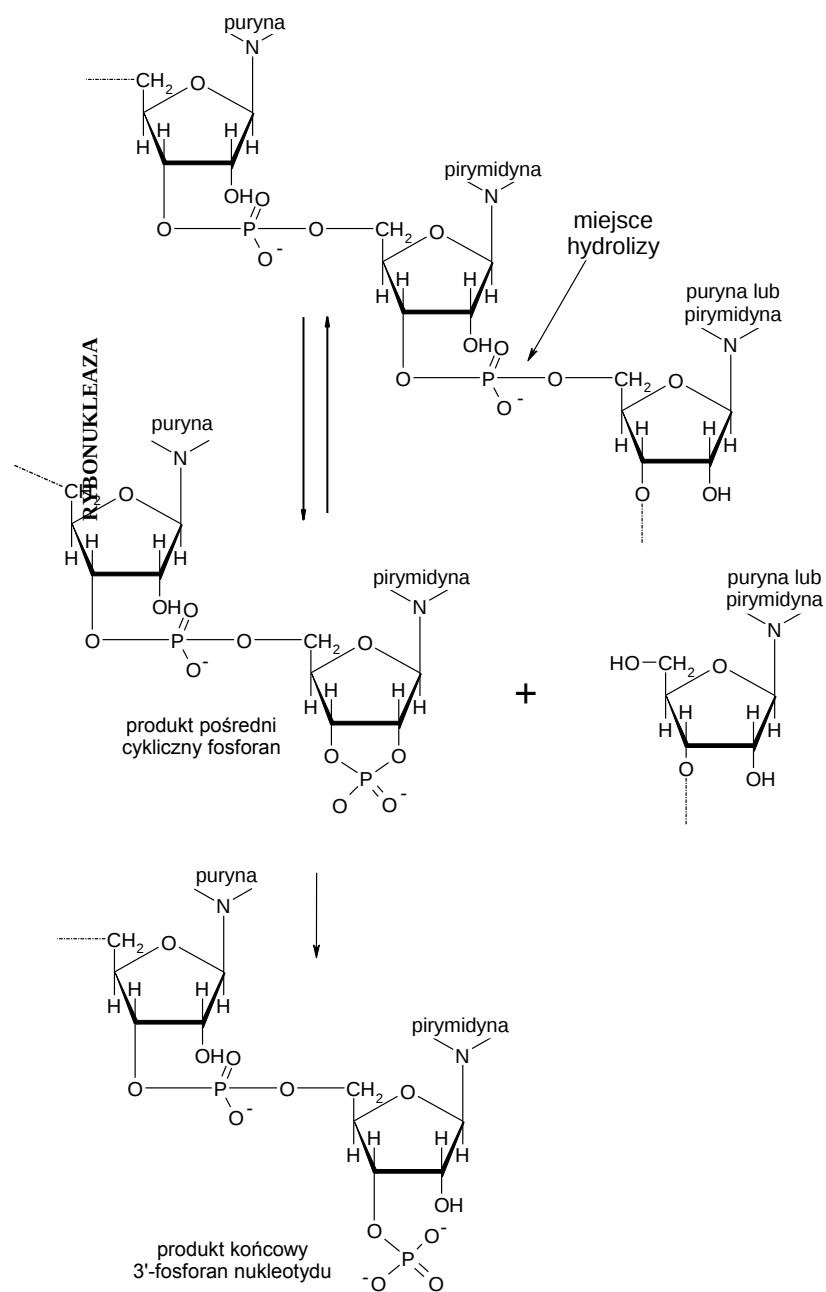
Materiały i odczynniki

- ślina
- 0,5% roztwór skrobi w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,0
- 0,9% NaCl
- 0,1 M bufor octanowy o pH 5,0
- odczynnik dinitrosalicylowy (DNS): 1 g kwasu dinitrosalicylowego, 20 ml 2 M NaOH oraz 3 g winianu sodowo-potasowego rozpuścić i uzupełnić do 100 ml wodą destylowaną

4.10. RYBONUKLEAZA TRZUSTKOWA

Rybonukleaza trzustkowa (EC 3.1.27.5) jest enzymem hydrolizującym RNA. Zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie 13 700 Da (składającego się ze 124 aminokwasów) i posiada cztery mostki disiarczkowe. Jest enzymem stabilnym i np. ogrzewana do temp. 100°C w pH 2–5 po 30 minutach traci zaledwie 20% aktywności.

Rybonukleaza trzustkowa katalizuje jedynie hydrolizę wiązań fosfodiesterowych w łańcuchu RNA znajdujących się przy nukleotydach pirymidynowych, ponieważ pierścień purynowy jest zbyt duży, aby związać się w miejscu aktywnym. Miejscem hydrolizy są wiązania między atomem fosforu i atomem tlenu na węglu 5' rybozy sąsiedniego nukleotydu. W wyniku rozerwania tego wiązania na węglu 5' rybozy powstaje wolna grupa –OH, a na węglu 3' rybozy, należącej do nukleotydu pirymidynowego, wolna grupa fosforanowa. Związkiem pośrednim powstającym w procesie hydrolizy jest cykliczny fosforan (Rys. 4.22). Produktami końcowymi hydrolizy są fragmenty oligonukleotydowe zakończone nukleotydami pirymidynowymi.



Rys. 4.22. Reakcja hydrolizy RNA przez rybonukleazę trzustkową

4.10.1. Ekstrakcja rybonukleazy z trzustki do 5% kwasu trichlorooctowego

Malicka M. (1972) Arch. Immunol. Ther. Exp. 20, 555-559.

Zasada metody

Rybonukleaza trzustkowa jest enzymem o niewielkiej masie cząsteczkowej (13 700 Da), co sprawia, że jest rozpuszczalna w 5% TCA i dzięki dużej stabilności nie traci aktywności w tym roztworze. Większość białek ekstrahujących się w tych warunkach z trzustki ulega denaturacji i wytrąceniu.

Postępowanie

1. Zmieloną trzustkę ekstrahować 30 minut na mieszadło magnetycznym do 2 objętości 5% TCA (2 l TCA na 1 kg tkanki), po czym wirować przez 15 minut przy szybkości około 6 000 obr./min.
2. Klarowny supernatant doprowadzić do pH 5,0 za pomocą 1N NaOH.
3. W preparacie oznaczyć stężenie białka (rozdział 3.10.3).

Materiały i odczynniki

- zamrożona trzustka bydlęca lub wieprzowa
- elektryczna maszynka do mięsa
- 5% kwas trichlorooctowy (TCA)
- 1 M NaOH

4.10.2. Oznaczanie aktywności rybonukleazowej zmodyfikowaną metodą Anfinsena

Anfinsen Ch.B., Redfield R.R., Choate W.L., Page J., Carrol W.R. (1954). J. Biol. Chem. 207, 201–210.

Zasada metody

Rybonukleaza trzustkowa hydrolizuje RNA do fragmentów oligonukleotydowych rozpuszczalnych w kwasie chlorowym (VII) (nadchlorowy) (patrz rozdział 4.10). Stężenie tych produktów można oznaczyć poprzez pomiar absorbancji przy 260 nm. RNA niestrawiony przez enzym wytrąca się w tych warunkach w postaci osadu.

Postępowanie

1. Ekstrakt z trzustki (rozdział 4.10.1) w ilości 25, 50 i 100 μ l uzupełnić 0,1 M buforem octanowym o pH 5,0 do objętości 1,5 ml.
2. Próby, wraz z próbą kontrolną zawierającą sam bufor octanowy, wstawić do łaźni wodnej i preinkubować 5 minut w temp. 37°C. W łaźni wodnej umieścić również 0,8% roztwór RNA (substrat).
3. Do wszystkich prób dodać po 1 ml ogrzanego do temperatury 37°C roztworu RNA.
4. Dokładnie po 10 minutach reakcję przerwać przez dodanie 0,5 ml 25% kwasu nadchlorowego zawierającego 0,75% octan uranylu.
5. Próby wyjąć z łaźni i wstawić na 15 minut do zlewki z lodem, następnie wirować (10 minut, ok. 10 000 obr./min)
6. Z klarownych supernatantów pobrać po 0,1 ml, uzupełnić do 3 ml wodą destylowaną i zmierzyć absorbancję przy 260 nm. Za jedną jednostkę aktywności przyjąć przyrost A_{260} o 0,1 w stosunku do próby kontrolnej.
7. Obliczyć aktywność całkowitą i właściwą ekstraktu. Białko w ekstrakcie oznaczyć metodą biuretową (rozdział 3.10.3)

Materiały i odczynniki

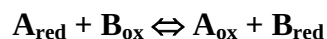
- preparat rybonukleazy trzustkowej uzyskany w doświadczeniu 4.10.1
- 0,8% roztwór RNA (**Uwaga!** W przypadku uzyskania wysokich absorbancji prób kontrolnych, roztwór RNA dializować do wody)
- 0,1 M bufor octanowy o pH 5,0

- 25% kwas chlorowy (VII) (nadchlorowy) z 0,75% octanem uranylu

4.11. OKSYDOREDUKTAZY

Do klasy oksydoreduktaz (EC 1) należą wszystkie enzymy katalizujące reakcje typu redoks, tj. przebiegające ze zmianą stopnia utlenienia związków organicznych. Zmiany te związane są z przeniesieniem protonów i elektronów z jednego substratu na drugi, bądź z bezpośrednim włączeniem tlenu do cząsteczki.

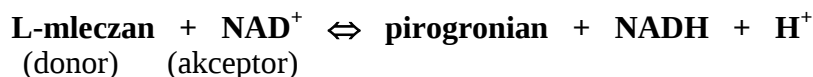
W reakcji tego typu substrat ulegający utlenieniu jest donorem protonów lub elektronów, a substrat ulegający redukcji – ich akceptorem.



nazwa tych enzymów jest tworzona wg schematu:

„oksydoreduktaza nazwa donora : nazwa akceptora”

Na przykład dehydrogenaza mleczanowa (EC 1.1.1.27), enzym katalizujący w procesie fermentacji przemianę kwasu pirogronowego do kwasu mlekowego zgodnie z reakcją:



nosi nazwę systematyczną „oksydoreduktaza L-mleczan : NAD⁺”.

Zalecane przez Komisję Enzymową potoczne nazwy tych enzymów to dehydrogenazy, ewentualnie reduktazy (nazwę enzymu tworzy się wtedy wg schematu „reduktaza + nazwa akceptora”, np. reduktaza azotanowa), bądź – jeżeli akceptorem jest tlen cząsteczkowy – oksydazy.

Ze względu na charakter katalizowanych przemian, typową cechą tych enzymów jest zależność ich aktywności od obecności grup prostetycznych lub koenzymów, zdolnych do przechodzenia od stanu utlenionego do zredukowanego. Funkcje te pełnią głównie:

- nukleotydy nikotynamidoadeninowe (NAD⁺, NADP⁺)
- nukleotydy flawinowe (FAD, FMN)
- układy porfiryne (hem)
- centra żelazo-siarkowe (centra Fe-S)
- związki chinonowe (np. koenzym Q)
- kwas liponowy
- jony miedzi

Grupy prostetyczne i koenzymy oksydoreduktaz nie odpowiadają klasycznej definicji katalizatora, gdyż ulegają przekształceniu w trakcie katalizowanego procesu. Koenzymy – luźno związane z białkami, a ponadto wchodzące w reakcje z substratami w określonych stosunkach stechiometrycznych – wykazują wiele właściwości wspólnych z substratami, i w taki sposób są też traktowane przy rozpatrywaniu przebiegu reakcji katalizowanych z ich udziałem.

Klasa oksydoreduktaz obejmuje obecnie 22 podklasy, wydzielone przez Komisję Enzymową na podstawie charakteru grupy funkcyjnej donora, np. podklasa EC 1.1 to enzymy działające na grupę CH-OH donora, podklasa EC 1.2 – działające na grupę aldehydową lub ketonową donora, itd.

Przyjmując za kryterium podziału rodzaj katalizowanej reakcji, w obrębie klasy oksydoreduktaz wyróżnia się 4 podgrupy:

1. **Dehydrogenazy** – katalizują odłączanie atomów wodoru od utlenianego substratu z przeniesieniem ich na inne związki. Nie przenoszą elektronów bezpośrednio na tlen. Ich najczęstszymi kofaktorami są NAD⁺, NADP⁺, FMN, FAD i liponian. Enzymy te

wykazują specyficzność zarówno w stosunku do substratów jak i koenzymów. Do tej podgrupy należą m.in.: dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (enzym uczestniczący w procesie glikolizy), dehydrogenazy: alkoholowa i mleczanowa (enzymy procesów fermentacji) oraz enzymy cyklu kwasów trikarboksylowych (cyklu Krebsa): dehydrogenaza izocytrynianowa, α -ketoglutarynowa, bursztynianowa, jabłczanowa.

2. **Oksydazy** – enzymy katalizujące odłączanie elektronów od utlenianego substratu i przenoszenie ich na tlen cząsteczkowy. Przyłączenie protonów prowadzi do powstania cząsteczki H_2O lub H_2O_2 . Przykłady: oksydaza cytochromowa (ostatni enzym łańcucha oddechowego), oksydaza ksantynowa (uczestnicząca w przemianie nukleotydów purynowych).
3. **Oksygenazy** – enzymy katalizujące proces wbudowywania tlenu do cząsteczki związku organicznego. Wyróżnia się dwa typy oksygenaz:
 - **oksygenazy właściwe** – działają na jeden substrat (donor), katalizując przyłączenie 2 atomów tlenu do jego cząsteczki (np. oksygenaza hemowa, uczestnicząca w procesie rozpadu hemu)
 - **oksygenazy mieszane** (oksydoreduktazy hydroksylujące, inaczej: hydroksylazy), działające jednocześnie na dwa odrębne substraty (dwa donory), katalizują włączenie 1 atomu tlenu do jednego z substratów z utworzeniem grupy hydroksylowej z jednoczesnym utworzeniem cząsteczki wody z drugiego atomu tlenu i atomów wodoru pochodzących z drugiego substratu (np. hydroksylaza fenyloalaninowa – enzym odpowiedzialny za przekształcenie fenyloalaniny w tyrozynę).
4. **Hydroksyperoksydazy** – enzymy katalizujące utlenianie substratów z udziałem nadtlenu wodoru jako akceptora. Obejmują 2 typy enzymów:
 - **peroksydazy** (głównie pochodzenia roślinnego) – katalizujące utlenianie różnych związków organicznych, najczęściej fenoli i amin aromatycznych
 - **katalazy** (pochodzenia roślinnego i zwierzęcego) – katalizujące rozpad H_2O_2 , przy czym związek ten pełni jednocześnie funkcje donora i akceptora wodoru.

Oksydoreduktazy pełnią kluczową rolę w metabolizmie komórkowym, szczególnie ze względu na udział w procesach pozyskiwania energii na drodze utleniania biologicznego. Biologiczne utlenianie wodoru, przebiegające z udziałem wielu układów oksydoredukcyjnych, pozwala na stopniowe uwalnianie energii, co daje możliwość jej magazynowania w postaci energii chemicznej związków wysokoenergetycznych.

Specyficzną funkcją podgrupy hydroksyperoksydaz jest ochrona komórki przed działaniem toksycznego H_2O_2 , który powstaje w niektórych reakcjach utleniania.

4.11.1. Izolacja mitochondriów z wątroby kurczęcia

Szopa J. Molekularna organizacja komórki. Praca zbiorowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1992.

Sawant P.L., Shibiko S. (1964) Biochim. Biophys. Acta 85, 82–86.

Zasada metody

Izolacja mitochondriów metodą przedstawioną poniżej obejmuje homogenizację tkanki oraz frakcjonowanie homogenatu.

Homogenizację przeprowadza się w teflonowo-szklanych homogenizatorach Pottera-Elvehjema, co powoduje fragmentację błony plazmatycznej komórek i zerwanie połączeń pomiędzy organellami, pozwala natomiast zachować integralność poszczególnych organelli. Efekt homogenizacji osiąga się na skutek tarcia powstałego przy przepychaniu materiału przez wąską szczelinę pomiędzy tłokiem a ścianą naczynia.

Fracje subkomórkowe uzyskuje się metodą wirowania różnicowego dzięki różnicom w szybkości sedymentacji organelli.

Całość preparacji prowadzi się w 0,25 M roztworze sacharozy, który zapewnia izoosmotyczność z wnętrzem organelli i pozwala wyodrębnić je w stanie nienaruszonym.

Postępowanie

Uwaga! Wszystkie etapy preparacji prowadzić w temperaturze 4°C. W trakcie izolacji preparaty przechowywać w pojemniku z pokruszonym lodem.

Postępowanie

1. 5 g wątroby kurczęcia wstępnie rozdrobnić, a następnie homogenizować w ręcznym homogenizatorze Pottera-Elvehjema z ok. 15–25 ml schłodzonego 0,25 M roztworu sacharozy. Homogenizację prowadzić tylko do czasu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Zbyt intensywna homogenizacja może uszkodzić mitochondria.
2. Uzupełnić homogenat do ok. 40 ml 0,25 M roztworem sacharozy i odwirować (10 min, $600 \times g$).
3. Supernatant zdekantować delikatnie znad osadu do zlewki, uważając, by nie zanieczyścić go bardzo luźnym osadem. Supernatant zachować do dalszej preparacji.
4. Osad ponownie zawiesić w ok. 20 ml 0,25 M sacharozy i odwirować (10 min, $600 \times g$).
5. Uzyskany supernatant połączyć z supernatantem z pierwszego wirowania; osad odrzucić. Połączone supernatanty odwirować (5 min, $15\,000 \times g$).
6. Supernatant łącznie z luźnym osadem różowych mikrosomów odrzucić. Osad brązowych mitochondriów zawiesić w ok. 10 ml sacharozy i odwirować (5 min, $15\,000 \times g$).
7. Powtórzyć postępowanie z punktu 6.
8. Otrzymaną frakcję mitochondrialną zawiesić w ok. 1 ml 0,25 M sacharozy.

Materiały i odczynniki

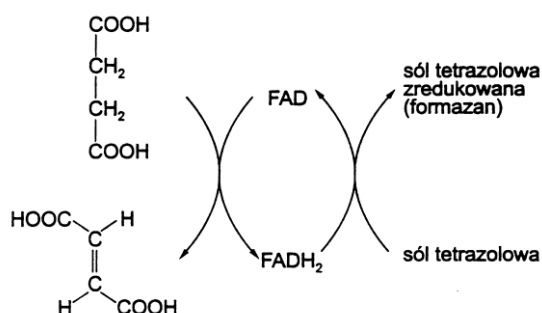
- wątroba kurczęcia
- 0,25 M sacharoza (wodę destylowaną przed sporządzeniem roztworu należy przegotować lub zubożyć małą objętością roztworu Tris)

4.11.2. Wykazywanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej we frakcji mitochondrialnej

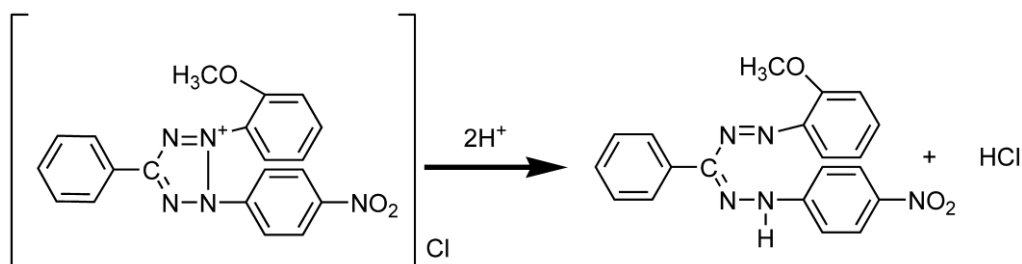
Kłyszewko-Stefanowicz L. Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Zasada metody

Dehydrogenaza bursztynianowa (oksydoreduktaza bursztynian : akceptor, EC 1.3.99.1) – enzym znacznikowy wewnętrznej błony mitochondrialnej – utlenia kwas bursztynowy do kwasu fumarowego z przeniesieniem atomów wodoru na FAD, a następnie na łańcuch oddechowy. W poniższej metodzie odłączone atomy wodoru są przenoszone na sól tetrazolową (chlorek trifenylo-tetrazolowy), powodując jej redukcję, co prowadzi do powstania purpurowo zabarwionej pochodnej – trifenyloformazanu (Rys. 4.23 i Rys. 4.24).



Rys. 4.23. Zasada metody wykazywania aktywności dehydrogenazy bursztynianowej wg Kłyszewko-Stefanowicz, 2003



Rys. 4.24. Reakcja redukcji chlorku trifenylotetrazolowego do trifenylformazanu.

wg Kłyszewko-Stefanowicz, 2003

Postępowanie

1. Przygotować bezpośrednio przed reakcją mieszaninę reakcyjną i próbę kontrolną o następującym składzie:

odczynnik	mieszanina reakcyjna	próba kontrolna
10% bursztynian sodu	0,4 ml	—
0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,4	0,8 ml	0,8 ml
4 mM CaCl ₂	0,3 ml	0,3 ml
4 mM AlCl ₃	0,3 ml	0,3 ml
0,1% błękit nitrotetrazolowy	1,0 ml	1,0 ml
H ₂ O	0,2 ml	0,6 ml

2. Do próby badanej i kontrolnej wprowadzić delikatnie 10 µl zawiesiny frakcji mitochondrialnej (rozdział 4.10.1). Nie mieszać!
3. Próby inkubować w temp. 37°C przez 15 minut. Mitochondria w postaci osadu na dnie probówki wybarwiają się na purpurowo. W przypadku naruszenia błon mitochondrialnych i uwalniania się enzymu do środowiska, na purpurowo zabarwia się mieszanina inkubacyjna.

Materiały i odczynniki

- frakcja mitochondrialna (uzyskana w doświadczeniu 4.11.1)
- 10% bursztynian sodu
- 0,1 M bufor fosforanowy, pH 7,4
- 4 mM CaCl₂
- 4 mM AlCl₃
- 0,1% błękit nitrotetrazolowy

4.11.3. Oznaczanie aktywności oksydazy cytochromu c we frakcji mitochondrialnej

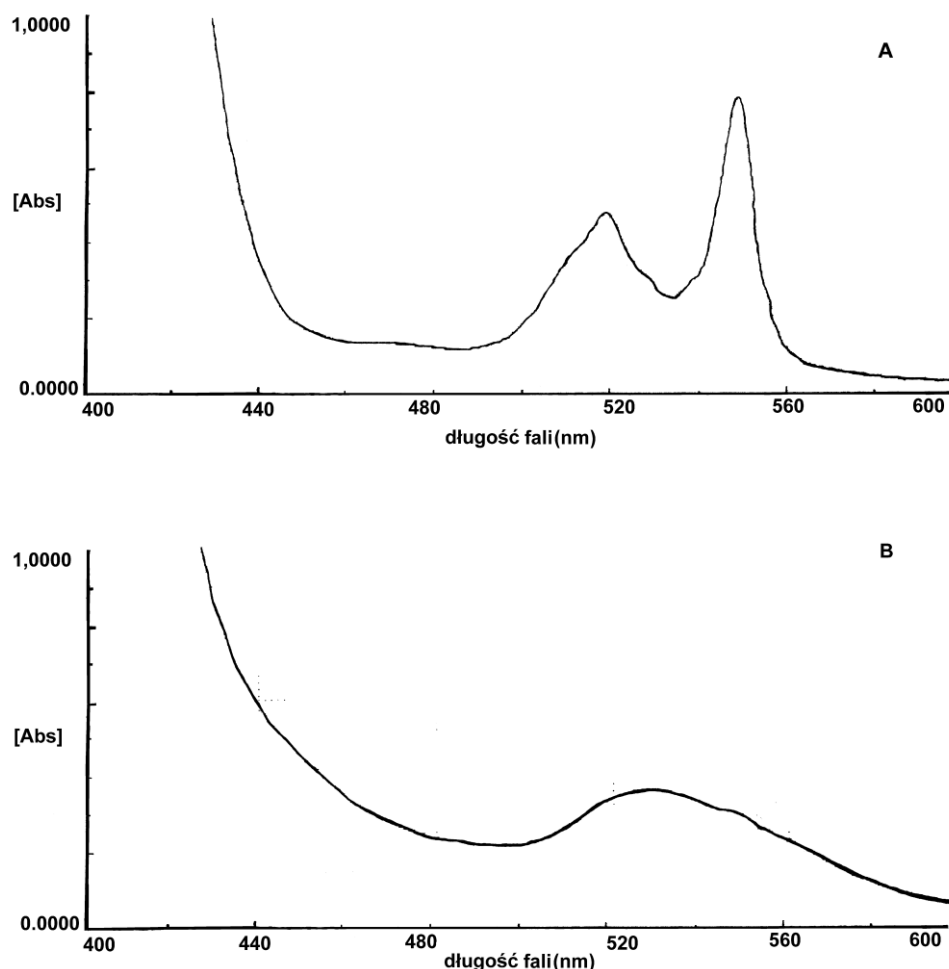
Szopa J. Molekularna organizacja komórki. Praca zbiorowa, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1992.

Zasada metody

Oksydoreduktaza cytochromu c (oksydoreduktaza cytochrom c : tlen; EC 1.9.3.1) jest jednym z 3 głównych kompleksów białkowych oddechowego łańcucha transportu elektronów, występujących w obrębie wewnętrznej błony mitochondrialnej.

Oksydoreduktaza cytochromu c, będąca terminalnym składnikiem łańcucha oddechowego, katalizuje reakcję przeniesienia elektronów z cytochromu c na tlen cząsteczkowy. Reakcja ta polega na czteroelektronowej redukcji cząsteczki O₂ do H₂O, z jednoczesnym przepompowaniem 2 protonów do przestrzeni międzybłonowej.

Oznaczanie aktywności oksydoreduktazy cytochromu c opiera się na monitorowaniu zmian stężenia zredukowanego cytochromu c poprzez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 550$ nm. Maksimum absorbancji w tym paśmie jest charakterystyczne tylko dla cytochromu w stanie zredukowanym (Rys. 4.25). W miarę przebiegu reakcji utleniania cytochromu c obserwuje się stopniowy spadek wartości absorbancji A_{550} . Aktywność oksydazy cytochromu c oznacza się więc poprzez pomiar ubytku substratu – zredukowanego cytochromu c.



Rys. 4.25. Widmo absorpcyjne cytochromu c w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0

A-cytochrom zredukowany, B – cytochrom utleniony

Postępowanie

1. Przygotować spektrofotometr do pomiaru przy długości fali $\lambda = 550$ nm. Ustawić zero pomiarowe aparatu na 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,0.
2. Do probówki Eppendorfa odmierzyć 5 μ l frakcji mitochondrialnej (przed pobraniem zawiesinę mitochondriów należy zamieszać) i 5 μ l 0,1% roztworu Tween 80. Zmieszać i odczekać 1 minutę. Następnie dodać 1 ml 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,0 a na końcu 100 μ l roztworu zredukowanego cytochromu c. Szybko wymieszać, przenieść do kuwety i rozpocząć pomiar A_{550} .
3. Zmiany notować co 15 sekund przez 3–5 minut. Uwaga! Jeżeli szybkość reakcji jest zbyt duża, frakcję mitochondrialną należy rozcieńczyć 0,25 M sacharozą.
4. Przeprowadzić pomiary dla 2 prób kontrolnych (dla enzymu $[E^+S^-]$ i dla substratu $[E^-S^+]$) w analogiczny sposób jak dla próby badanej. Skład poszczególnych prób przedstawia tabela zamieszczona poniżej.

	próba badana [E ⁺ S ⁺]	próba kontrolna dla enzymu [E ⁺ S ⁻]	próba kontrolna dla substratu [E ⁻ S ⁺]
frakcja mitochondrialna	5 µl	5 µl	–
0,25 M sacharoza	–	–	5 µl
0,1% Tween 80	5 µl	5 µl	5 µl
0,1 M buf. fosforanowy, pH 7,0	1 ml	1 ml + 100 µl	1 ml
zredukowany cytochrom c	100 µl	–	100 µl

- Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć aktywność oksydazy cytochromu c w uzyskanym preparacie. Za jedną jednostkę aktywności przyjąć taką ilość enzymu, która w warunkach testu powoduje spadek A₅₅₀ o 0,1 w ciągu 1 minuty.
- Oszacować aktywność całkowitą preparatu oraz aktywność w przeliczeniu na 1 g tkanki wątrobowej.

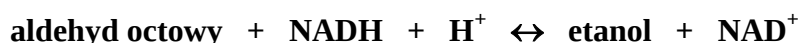
Materiały i odczynniki

- frakcja mitochondrialna (uzyskana w doświadczeniu 4.11.1)
- zredukowany cytochrom c: przygotować roztwór cytochromu c o stężeniu 5 mg/ml w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0; zredukować go przez dodanie kwasu askorbinowego w proporcji 3 mg kwasu askorbinowego na 1 mg cytochromu c; po zredukowaniu roztwór dializować do tego samego buforu dwukrotnie przez 12–24 godzin; stosunek absorbancji A₅₅₀/A₅₆₅ roztworu cytochromu c powinien osiągnąć wartość 6–10 (najlepiej w granicy 9–10)
- 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,0
- 0,1% Tween 80
- 0,25 M sacharoza

4.11.4. Dehydrogenaza alkoholowa

Dehydrogenaza alkoholowa (EC 1.1.1.1) – ADH (*ang. alcohol dehydrogenase*) – należy do klasy 1 enzymów (oksydoreduktazy), podklasy 1.1 (enzymy działające na grupy CH–OH donorów) i pod-podklasy 1.1.1 (z NAD⁺ lub NADP⁺ jako akceptorem). Jej nazwa systematyczna brzmi: oksydoreduktaza alkohol : NAD⁺. Jest cytoplazmatycznym enzymem szlaku fermentacji.

Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę alkoholową przebiega następująco:



Głównym znaczeniem tej reakcji jest regeneracja puli NAD⁺, co pozwala na kontynuowanie procesu glikolizy.

Dehydrogenaza alkoholowa z komórek drożdży – YADH (*ang. yeast alcohol dehydrogenase*) jest białkiem tetramerycznym o masie 140–150 kDa i masie podjednostki 36–37 kDa. Jest to metaloenzym; w centrum katalitycznym każdej podjednostki znajduje się jon Zn²⁺.

4.11.4.1. Izolacja dehydrogenazy alkoholowej z komórek drożdży

Affinity Chromatography. Principle and Methods. Broszura firmy Pharmacia Fine Chemicals. Kłyszewko-Stefanowicz L. Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.

Zasada metody

Barwnik Cibacron Blue F3G-A, związany kowalencyjnie do złoza Sepharose, wykazuje duże powinowactwo do wielu enzymów, w tym do enzymów zależnych od NAD⁺ i NADP⁺ (np. kinazy, dehydrogenazy) oraz do białek (albuminy, lipoproteiny, czynniki krzepnięcia

krwi, interferon). Zastosowanie takiego typu złoza o nazwie „Blue Sepharose” pozwala na izolację powyższych związków metodą chromatografii powinowactwa.

W przypadku chromatografii na złożu Blue-Sepharose CL-6B najczęściej stosuje się elucję biospecyficzną, która pozwala na selektywną izolację zaadsorbowanych białek.

Postępowanie

Przygotowanie kolumny do chromatografii

1. Upakować kolumnę ok. 2 ml złoza Blue-Sepharose Cl-6B (lub Cibacron Blue F3G-A Agarose).
2. Zrównoważyć kolumnę przemywając złoże 10 ml buforu startowego (5-krotna objętość złoza).

Ekstrakcja białek drożdży

1. Komórki drożdży rozbić w młynku Browna, w niewielkiej ilości buforu do chromatografii.
2. Zmierzyć objętość zawiesiny komórek drożdży i dodać do niej 1% Triton X-100 do uzyskania końcowego stężenia detergentu 0,1%. Prowadzić ekstrakcję przez 30 minut na łaźni lodowej, przy stałym mieszaniu.
3. Ekstrakt odwirować (15 min, $10\,000 \times g$), a uzyskany supernatant dodatkowo przesączyć.
4. Oszacować stężenie białka w uzyskanym ekstrakcie poprzez pomiar A_{280} . Przyjąć orientacyjny właściwy współczynnik absorpcji $a_{280} = 10$. Uwaga! Ze względu na wysoką absorpcję Tritonu X-100 w paśmie 280 nm, wartość A_{280} prób badanych należy pomniejszyć o A_{280} prób kontrolnych, zawierających takie samo stężenie detergentu jak odpowiadające im próby badane.

Rozdział chromatograficzny

1. Ekstrakt z komórek drożdży rozcieńczyć buforem startowym w taki sposób, aby stężenie białka wynosiło ok. 10 mg/ml, po czym odwirować (10 min, $10\,000 \times g$).
2. Preparat nanieść na kolumnę w proporcji 20 mg białka/1ml złoza, przy przepływie 0,5 ml/min. Pozostawić ok. 1 ml nanoszonego preparatu do oznaczenia stężenia białka i aktywności dehydrogenazy.
3. Po naniesieniu preparatu, białka niewiążące się oraz niespecyficzenie zaadsorbowane na złożu odmywać buforem startowym aż do zaniku A_{280} , zbierając frakcje o objętości 4 ml, przy przepływie 0,5 ml/min.
4. Białka swoicie związane na złożu eluować za pomocą 5 mM NAD^+ w buforze startowym (ok. 6 ml), zbierając frakcje o objętości 1 ml, przy przepływie 1 ml/min. Następnie kolumnę przemywać buforem startowym aż do zaniku A_{280} .
5. W zebranych frakcjach określić obecność białka przy użyciu odczynnika Bradforda (50 μl danej frakcji + 50 μl odczynnika Bradforda) – niebieskie zabarwienie wskazuje na obecność białka we frakcji.
6. Pozostałe białka związane na złożu eluować 2 M NaCl w buforze startowym przy przepływie 1 ml/min, aż do zaniku A_{280} .
7. Po zakończeniu elucji kolumnę przemyć 20 ml H_2O , a następnie 6 ml 20% etanolu. Kolumnę można przechowywać do ponownego użycia w temperaturze 4°C.

Obliczenia

1. W preparacie nanoszonym na kolumnę i we frakcjach wyeluowanych 5 mM NAD^+ (zawierających białko) oznaczyć aktywność dehydrogenazy alkoholowej (rozdział 4.10.4.2) i dokładne stężenie białka metodą Bradforda (rozdział 3.10.5).
2. Obliczyć aktywność właściwą preparatu wyjściowego oraz preparatu dehydrogenazy alkoholowej oczyszczonego na złożu Blue-Sepharose CL-6B. Określić stopień oczyszczenia preparatu.

Materiały i odczynniki

- drożdże
- bufor do chromatografii (startowy) o pH 6,4 zawierający: 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 0,4 mM EDTA i 2 μM ditiotretiol (DTT)
- 5 mM roztwór NAD^+ w buforze startowym

- 2 M NaCl w buforze startowym
- złoże Blue-Sepharose CL-6B (Pharmacia) lub Cibacron Blue F3G Agarose (Sigma)
- 1% Triton X-100

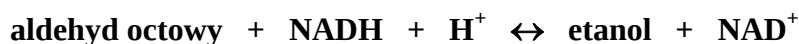
4.11.4.2. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy alkoholowej

Boyer P. (1975) The Enzymes: Vol.XI: Oxidation – Reduction. Part A.

Kłyszajko-Stefanowicz L. Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

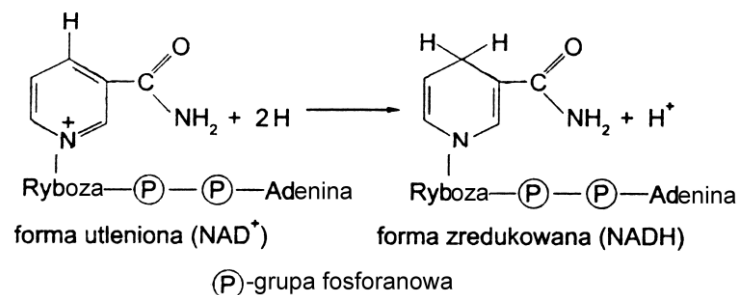
Zasada metody

Kierunek reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholową:

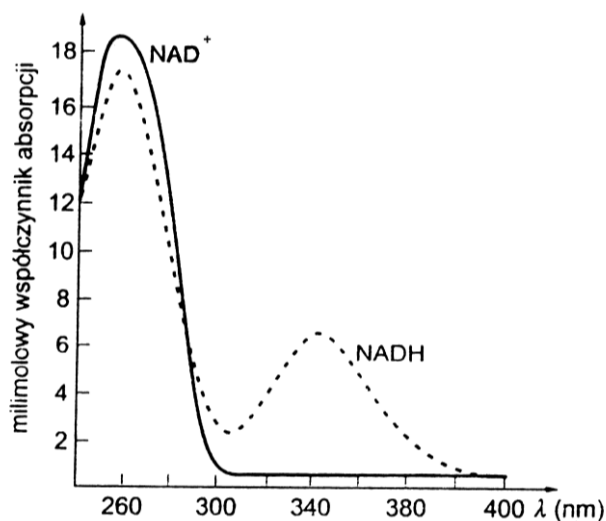


zależy od pH; w warunkach zasadowych, stosowanych w poniższej metodzie, równowaga reakcji jest przesunięta w kierunku tworzenia aldehydu z jednoczesną redukcją NAD^+ do NADH.

Przejście formy utlenionej NAD^+ w formę zredukowaną NADH (Rys. 4.26) można śledzić spektrofotometrycznie. Widma absorpcyjne formy utlenionej i zredukowanej dinukleotydu nikotynamidoadeninowego wykazują znaczne różnice (Rys. 4.27). Obie formy wykazują silne pasmo absorpcyjne przy $\lambda = 260$ nm, zależne od obecności pierścienia purynowego i pirymidynowego, natomiast tylko postać zredukowana (NADH) ma dodatkowe pasmo absorpcji przy długości fali 340 nm. Jest to wynik redukcji pierścienia pirydynowego w amidzie kwasu nikotynowego prowadzącego do zaniku jego struktury aromatycznej z jednoczesnym powstaniem układu dihydropirydyny.



Rys. 4.26. Forma utleniona i zredukowana dinukleotydu nikotynamidoadeninowego



Rys.4.27. Widma absorpcyjne NAD^+ i NADH

wg Kłyszajko-Stefanowicz L., 2003

Szybkość reakcji powstawania aldehydu octowego i NADH można mierzyć poprzez pomiar przyrostu absorbancji przy 340 nm. Miarą szybkości reakcji są zmiany wartości A_{340} w jednostce czasu.

Metoda pomiaru zmian A_{340} w czasie reakcji katalizowanych przez dehydrogenazy, których koenzymem jest NAD^+ lub NADP^+ , zwana jest optycznym testem Warburga. Jest to metoda szeroko stosowana do oznaczania aktywności wielu dehydrogenaz oraz enzymów katalizujących reakcje sprzężone z dehydrogenazami, gdzie w końcowym etapie także zachodzi redukcja nukleotydów pirydynowych.

Postępowanie

1. Przygotować mieszaninę reakcyjną – zmieszać: 1,45 ml 0,1 M buforu Tris-HCl o pH 8,8, 50 μl 5 mM NAD^+ i 5–10 μl preparatu dehydrogenazy.
2. Po zmieszaniu powyższych składników zmierzyć A_{340} (w razie potrzeby poczekać na ustabilizowanie wartości A_{340}).
3. Reakcję zapoczątkować przez dodanie 10 μl etanolu i natychmiast rozpocząć pomiary A_{340} . Wartości absorbancji odczytywać co 30 sekund.
5. Przeprowadzić pomiary dla odpowiednich prób kontrolnych: $[\text{E}^+\text{S}^-]$ i $[\text{E}^-\text{S}^+]$.
6. Na podstawie przyrostu A_{340}/min oznaczyć aktywność preparatu enzymu w J/ml. Molowy współczynnik absorpcji dla NADH wynosi $\epsilon_{340} = 6\,220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

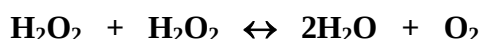
Materiały i odczynniki

- preparat dehydrogenazy alkoholowej uzyskany w doświadczeniu 4.11.4.1.
- 0,1 M bufor Tris-HCl, pH 8,8
- 5 mM NAD^+
- etanol (cz.d.a)

4.11.5. Katalaza

Zasada metody

Katalaza (EC 1.11.1.6) jest enzymem obecnym w peroksysomach prawie wszystkich komórek eukariotycznych. W dużej ilości występuje w krwinkach czerwonych, komórkach wątroby, a w mniejszej w komórkach roślinnych (np. ziemniak). Enzym jest hemoproteiną zbudowaną z 4 podjednostek, z których każda zawiera w centrum aktywnym ugrupowanie hemowe. Jej funkcja sprowadza się do detoksykacji powstającego w komórkach nadlenku wodoru z wytworzeniem wody i tlenu cząsteczkowego:



Postępowanie

1. W trzech probówkach umieścić niewielkie ilości (około 0,5 g) utartych ziemniaków i dodać 0,5 ml wody destylowanej.
2. Zawartość jednej z probówek zagotować we wrzącej łaźni i ostudzić, drugą umieścić w zamrażarce, a trzecią pozostawić w temperaturze pokojowej. Wszystkie próby inkubować w podanych warunkach przez 10 minut.
3. Do każdej probówki dodać 2 ml 3% wody utlenionej. Wydzielające się pęcherzyki tlenu świadczą o zachodzącej reakcji enzymatycznej.
4. Porównać wyniki otrzymane w poszczególnych próbach.

Materiały i odczynniki

- ziemniak
- 3% woda utleniona

4.12. AMINOTRANSFERAZY

W wyniku degradacji białek, zachodzącej u zwierząt m. in. w wątrobie i mięśniach, a w roślinach np. podczas kiełkowania nasion, powstają wolne aminokwasy. Rozkład większości aminokwasów rozpoczyna się od usunięcia grupy α -aminowej. Grupy te są najczęściej przenoszone na węgiel karbonylowy 2-oksokwasu (α -ketokwasu) przez aminotransferazy. Reakcje te są odwracalne, a ich kierunek zależy od względnego stężenia pary aminokwas – 2-oksokwas. W wyniku reakcji transaminacji substrat aminokwasowy staje się oksokwasem, a wchodzący w reakcję oksokwas – aminokwasem. Z tego względu, aminotransferazy odgrywają rolę nie tylko w rozkładzie aminokwasów, ale także ich syntezie.

Ważnymi aminotransferazami w metabolizmie zwierząt i roślin są aminotransferazy asparaginianowa (AST) i alaninowa (ALT). Są to enzymy przenoszące w sposób odwracalny grupę $-\text{NH}_2$, odpowiednio, z L-asparaginianu i L-alaniny na 2-oksoglutaran (α -ketoglutaran). U zwierząt powstający L-glutaminian ulega deaminacji oksydacyjnej. W dalszych etapach, uwolnione jony amonowe (NH_4^+) dają mocznik. U roślin aminotransferazy są ważne dla przebiegu fotosyntezy (rośliny typu C4) i regulacji fotooddychania, ale także mają znaczenie w warunkach stresowych, tj. niedobór azotu czy tlenu.

4.12.1. Wykazywanie aktywności ALT w kielkach lucerny z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej

Zasada metody

Postęp reakcji transaminacji w kierunku tworzenia glutaminianu może być śledzony z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej i barwienia rozdzielonych aminokwasów ninhydryną (por. rozdział 2.6.4). Źródłem enzymu jest ekstrakt przygotowany z kielków lucerny, substratami – L-alanina i 2-oksoglutaran.

Postępowanie

Przygotowanie ekstraktu z kielków lucerny

1. Odważyć około 3g kielków lucerny, odnotować ich dokładną masę.
2. Kielki umieścić w schłodzonym moździerzu, zalać zimnym buforem do homogenizacji (3ml/1g tkanki), rozetrzeć tłuczkiem na możliwie jednolitą masę. Cały homogenat przenieść do schłodzonej probówki wirówkowej.
3. Homogenat wirować 10 min. w 4°C przy 18 000×g. Ostrożnie zlać supernatant znad osadu.
4. Odnotować objętość supernatantu. Preparat przechowywać w lodzie.
5. Uzyskany preparat poddać filtracji żelowej na kolumnie PD10 w celu zmiany buforu oraz usunięcia drobnocząsteczkowych składników ekstraktu.

Uwaga! Filtracji żelowej poddać 2,5ml preparatu stosując się do instrukcji dla kolumny PD10. Do elucji zastosować 0,3M bufor fosforanowy, pH 7,5.

Uwaga! W razie potrzeby, przed nałożeniem na kolumnę, preparat ponownie odwirować 5 min. w 4°C przy 13 000×g.

Uwaga! Kolumna PD10 wymaga wcześniejszego przygotowania.

Po zakończeniu odsalania, kolumnę PD10 przemyć 50ml wody destylowanej.

Opracowanie wyników

Opisać sposób przygotowania ekstraktu z kielków lucerny, podając m.in. najważniejsze wartości liczbowe.

Materiały i odczynniki

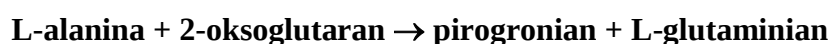
– Kielki lucerny (*Medicago sativa*)

- Bufor do homogenizacji: 0,05M Tris-HCl pH 7,6; 0,4M sacharoza, 0,2% surowicza albumina wołowa (BSA, Bovine Serum Albumin), 10mM DTT
- 0,3M bufor fosforanowy, pH 7,5
- lód
- mózdzierz
- wirówka z chłodzeniem
- kolumna do odsalania PD10 wraz z instrukcją (PD10 Desalting Column, GE Healthcare)

Reakcja transaminacji L-alanina:2-oksoglutaran

Zasada oznaczenia

Aminotransferaza alaninowa katalizuje (w warunkach testu) przeniesienie grupy aminowej z alaniny na 2-oksoglutaran tworząc pirogronian i glutaminian:



Reakcja jest prowadzona w 37°C, w optymalnych warunkach pH (7,5). W określonych odstępach czasu część mieszaniny reakcyjnej jest przenoszona do próbówki zawierającej TCA w celu zahamowania reakcji. TCA powoduje wytrącenie białek z roztworu. Aminokwasy pozostają rozpuszczalne w roztworze.

Postępowanie

1. W probówce Eppendorfa przygotować na świeżo 0,25ml mieszaniny substratów: 200mM L-alanina, 40mM 2-ketoglutaran w 0,15M buforze fosforanowym, pH 7,5.
2. Do 5 probówek Eppendorfa nakropić po 1 kropli 100% TCA.
3. Przygotować mieszaninę reakcyjną poprzez dodanie 0,25ml ekstraktu z kiełków do 0,25ml mieszaniny substratów.
4. Reakcję prowadzić w temp. 37°C.
5. Do przygotowanych probówek z TCA przenosić po 75μl mieszaniny reakcyjnej po czasie trwania reakcji 0, 5, 10, 30 i 60min.
6. Próby odwirować w wirówce stołowej przy maksymalnych obrotach przez 3min.

Opracowanie wyników:

Przedstawić warunki prowadzonej reakcji.

Materiały i odczynniki

- 0,3M bufor fosforanowy, pH 7,5
- 0,5M L-alanina w wodzie
- 0,5M 2-oksoglutaran w wodzie
- 100% kwas trichlorooctowy (TCA)
- ekstrakt z kiełków lucerny
- blok grzejny ustawiony na 37°C

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Postępowanie

1. Umieścić niewielką ilość układu rozwijającego (do wysokości ok. 1cm) w komorze chromatograficznej i przykryć ją.
2. Na bibule zaznaczyć linię startu (ok. 1,5cm od brzegu płytki) i miejsca nanoszenia prób (2 standardy i 5 prób).
3. Na zaznaczone miejsca nanieść po 2μl standardów oraz po 2 μl supernatantów z poszczególnych prób w następującej kolejności: Ala, 0min, 5min., 10min., 30min., 60min., Glu.
4. Począć do wyschnięcia naniesionych prób.
5. Włożyć bibulę do komory chromatograficznej tak, aby jej dolna krawędź była równo zanurzona w układzie rozwijającym, a linia startu znajdowała się powyżej roztworu.

6. Komorę przykryć i rozwijać chromatograf do momentu, gdy czoło fazy ruchomej znajdzie się ok. 1cm od górnej krawędzi bibuły.
7. Bibułę dokładnie wysuszyć, a następnie spryskać roztworem ninhydryny.
8. Bibułę ponownie wysuszyć i umieścić na 1-1,5min. w suszarce laboratoryjnej rozgrzanej do 110°C.

Opracowanie wyników

1. Opisać warunki chromatografii.
2. Załączyć chromatogram (może być zdjęcie) z opisem.
3. Określić jakościowo skład mieszanin rozdzielanych w chromatografii.

Materiały i odczynniki

- próby pobrane w trakcie trwania reakcji transaminacji
- 50mM L-alanina w wodzie (standard)
- 50mM kwas glutaminowy w wodzie (standard)
- układ rozwijający: etanol:amoniak:woda 8:1:1
- 0,25% ninhydryna w acetonie
- bibuła Whatman No. 1
- komora chromatograficzna
- suszarka laboratoryjna ustawiona na 110°C

4.12.2. Oznaczanie aktywności ALT kolorymetryczną metodą Reitmana-Frankela w ekstrakcie z kielków lucerny

Zasada metody

Aminotransferazy katalizują przeniesienie grup aminowych z aminokwasów na 2-oksokwasy. Miarą aktywności aminotransferaz jest ilość powstałych oksokwasów, które w obecności 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH) przeprowadzane są w fenylohydrazony. Pochodne te charakteryzują się brunatno-czerwonym zabarwieniem w środowisku alkalicznym. Szybkość powstawania fenylohydrazonów z pirogronianu (produkt reakcji w warunkach testu) jest szybsze niż z α -ketoglutaranu (substrat reakcji w warunkach testu). Dodatkowo, fenylohydrazony powstałe z pirogronianu mają większy współczynnik absorpcji niż pochodne ketoglutaranu.

W pierwszej kolejności należy sporządzić krzywą wzorcową (standardową). W kolejnym etapie - oznaczyć aktywność enzymatyczną ekstraktu z kielków lucerny. Ponieważ nie jest znana aktywność aminotransferaz w przygotowywanych ekstraktach należy równolegle wykonać oznaczenia dla ekstraktu nierozcieńczonego oraz kilku jego rozcieńczeń (np. $\times 2$, $\times 5$, $\times 10$, $\times 20$ i $\times 50$).

Uwaga! Podczas odmierzania poszczególnych roztworów należy zwracać szczególną uwagę, aby znalazły się one w mieszaninie reakcyjnej (pipetowanie do roztworu) oraz, aby nie zanieczyścić wzajemnie odczynników (zmiana końcówek).

Wykonanie krzywej wzorcowej dla ALT

Nr próby:	1 (odczynnikowa)	2	3	4	5	6
DNPH [μl]	100	100	100	100	100	100
Substrat dla ALT [μl]	100	90	80	70	60	50
Wzorzec [μl]	—	10	20	30	40	50
0,3M b. fosf. pH 7,5 [μl]	20	20	20	20	20	20
Wymieszać i pozostawić na 5 min. w temp. pokojowej						
0,4M NaOH [ml]	1	1	1	1	1	1
Wymieszać, pozostawić na 5 min. w temp. pokojowej i odczytać A_{505} wobec próby odczynnikowej (1).						
Jednostki ALT (IU/dm³)*	0	40	80	140	225	325

* IU – jednostka międzynarodowa (*ang. international unit*)

Opracowanie wyników

Z uzyskanych wyników wykreślić krzywą wzorcową (zależność A_{505} od IU/dm³).

Wykonanie oznaczenia

Substrat dla ALT [μl]	100
Inkubować ok. 5 min. w 37°C	
🔗 Ekstrakt z kielków lucerny [μl]	20
Wymieszać i inkubować w 37°C przez dokładnie 30 min.	
DNPH [μl]	100
Wymieszać i pozostawić na 20 min. w temp. pokojowej	
0,4M NaOH [ml]	1
Wymieszać, pozostawić na 5 min. i odczytać A_{505} wobec prób odczynnikowych (zawierających odpowiednią objętość 0,3M buforu fosforanowego, pH 7,5 w miejsce ekstraktu).	

🔗 Oznaczenia wykonać równolegle dla ekstraktu nierozcieńczonego oraz rozcieńczonego 2 - 50×. Preparat rozcieńczać zimnym 0,3M buforem fosforanowym, pH 7,5 i przechowywać w lodzie.

Opracowanie wyników

1. Odczytać z krzywej wzorcowej aktywność ALT w poszczególnych próbach.
2. Przedstawić, w formie tabeli, skład poszczególnych prób badanych oraz uzyskane wyniki
3. Obliczyć średnią aktywność ALT w ekstrakcie [IU/dm³].
4. Obliczyć aktywność całkowitą [IU] ALT w ekstrakcie (należy wziąć pod uwagę, że do przygotowania końcowego ekstraktu wzięto tylko jego część (2,5ml), która uległa rozcieńczeniu do 3,5ml podczas filtracji żelowej).
5. Obliczyć aktywność w przeliczeniu na gram tkanki [IU/g].

Materiały i odczynniki

- ekstrakt z kielków lucerny przygotowany wg ćw. 4.10.6.1
- substrat dla ALT: 0,2M L-Ala + 2mM 2-oksoglutaran w 0,1M buforze fosforanowym pH 7,5
- DNPH (1mM 2,4-dinitrofenylohydrazyna w 1M HCl)
- wzorzec: 2mM pirogronian sodu w 0,1M buforze fosforanowym pH 7,5
- 0,3M bufor fosforanowy, pH 7,5
- 0,4M NaOH
- blok grzejny ustawiony na 37°C

W opracowaniu rozdziału Enzymy korzystano z następujących źródeł:

Dunlap R.B. (red) *Immobilized biochemicals and affinity chromatography*. Plenum Press New York 1974, 123–134.

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.

Kączkowski J. *Biochemia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.

Kłyszewko-Stefanowicz L. *Cytobiochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.

Kłyszewko-Stefanowicz L. *Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Lamkin G.E., King E.E. (1976) *Blue Sepharose: a reusable affinity chromatography medium for purification of alcohol dehydrogenase*. *Biochem Biophys Res Commun.* 72, 560–565.

Lehninger A.L. *Biochemia*. Państwowe Wydawnictwo Rolniczo-Leśne, Warszawa 1979.

Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Ćwiczenia z biochemii dla biologów*. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1992.

Minakowski W. *Biochemia kręgowców*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1990.

Stryer L. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Voet D., Voet J.G. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York 1990.

Zgirski A., Gondko R. *Obliczenia biochemiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.

Strona internetowa International Union of Pure and Applied Chemistry: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>

Strona internetowa Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB): <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>