

UM, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Encimske tehnologije

Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo)

Maja Leitgeb, Mateja Primožič in Katja Vasić

Študenti:

DOLOČEVANJE AKTIVNOSTI ENCIMOV

Teoretske osnove:

Encimi so kompleksne beljakovinske molekule, imenovani tudi biokatalizatorji, ki jih proizvajajo žive celice. So zelo specifični tako pri reakcijah, ki jih katalizirajo, kot pri izbiri reaktantov, ki so znani kot substrati. Encim običajno katalizira posamezno kemijsko reakcijo ali niz tesno povezanih reakcij. Neželeni učinki, kot je tvorba stranskih produktov, so pri encimsko kataliziranih reakcijah redki v primerjavi z neencimsko kataliziranimi reakcijami.

Encimi se uporabljajo na različnih področjih v živilski, papirni, usnjarski, kmetijski in tekstilni industriji. Obenem hiter znanstveni napredek spodbuja kemijsko in farmacevtsko industrijo k uporabi encimske tehnologije za pridobivanje produktov.

Ena izmed lastnosti encimov je njihova sposobnost neprekinjenega delovanja tudi po odstranitvi ali ločitvi iz celic. Tudi po ločitvi celic od *in vivo* okolja encimi še naprej učinkovito delujejo v pogojih *in vitro*; kar pomeni, da ti biokatalizatorji ostanejo v aktivnem stanju tudi po izolaciji.

Za katalitično delovanje encima zadostujejo že majhne količine le tega, ki je v primerjavi s koncentracijo substrata veliko manjša.

Izpostavitve encimov ekstremni temperaturi, pH ali z obdelavo z drugimi denaturirajočimi snovmi povzroči popolno izgubo njegove katalitične aktivnosti. Stopnja katalitične aktivnosti je v glavnem odvisna od celovitosti strukture encima kot proteina.

Aktivnost encima lahko določimo z določanjem količine nastalega produkta v določenem času ali količine substrata, ki ga encim porabi v danem času. Aktivnost encima je neposredno odvisna od njegove celotne količine, prisotne v vzorcu. Spremembe, ki nastanejo v mešanici med reakcijo pa na aktivnost bistveno ne vplivajo, če jo določujemo pri začetni hitrosti. Začetna hitrost reakcije se nanaša na čas v encimski reakciji, v katerem je sprememba koncentracije substrata, ki ga encim pretvori v produkt, še vedno zanemarljiva v primerjavi s celotno koncentracijo substrata, ki je prisotna v zmesi.

Encimska aktivnost je definirana kot količina encima, ki katalizira pretvorbo 1 μmol substrata na minuto, pri določenih pogojih (temperatura, pH, koncentracija substrata). Enota encimske aktivnosti je $U = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$ (μmol se ponavadi nanaša na koncentracijo pretvorjenega substrata ali nastalega produkta).

1. vaja: Določanje koncentracije proteinov v vodnem mediju po Bradfordu

a) Priprava Bradfordovega reagenta

Bradford-ov reagent se pripravi tako, da se raztopi 100 mg Coomassie Brilliant Blue v 50 mL 95 % etanola in v 100 ml 85 % (v/v) fosforne kisline (H_3PO_4). Sledi redčenje z destilirano vodo do oznake 1 L.

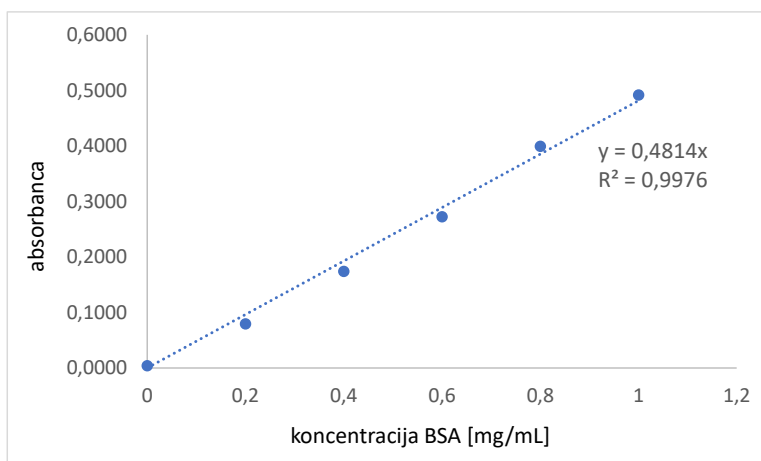
b) Priprava umeritvene krivulje

Za pripravo umeritvene krivulje se uporablja protein albumin v koncentracijskem območju od 0 do 1 mg/mL. Pripraviti je potrebno različne koncentracije albumina. Zatehtajte 10 mg albumina in dodajte 1 mL Milli-Q vode. Tako dobimo raztopino albumina s koncentracijo 10 mg/mL, ki jo nato redčite po naslednjem postopku:

	1000 μ L Milli-Q voda (Blank)	→	0,0 mg/mL
20 μ L albumina (10 mg/mL)	+ 980 μ L Milli-Q vode	→	0,2 mg/mL
40 μ L albumina (10 mg/mL)	+ 960 μ L Milli-Q vode	→	0,4 mg/mL
60 μ L albumina (10 mg/mL)	+ 940 μ L Milli-Q vode	→	0,6 mg/mL
80 μ L albumina (10 mg/mL)	+ 920 μ L Milli-Q vode	→	0,8 mg/mL
100 μ L albumina (10 mg/mL)	+ 900 μ L Milli-Q vode	→	1,0 mg/mL

c) Priprava vzorcev za določevanje koncentracije proteinov po Bradfordu

V 1,5 mL mikrocentrifugirke odpipetirajte 1 mL Bradfordovega reagenta. Dodajte 20 μ L vzorca in zvorteksirajte. Inkubirajte 15 minut pri sobni temperaturi. Po 15 minutah izmerite absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Za slepi vzorec Bradfordovemu reagentu dodajte 20 μ L destilirane vode. Koncentracijo proteinov določite s pomočjo umeritvene krivulje (Slika 1).



Slika 1: Umeritvena krivulja za določevanje koncentracije proteinov v vodni raztopini.

2. vaja: Določevanje aktivnosti lakaze

Aktivnost lakaze je določena z merjenjem absorbance oksidirane ABTS pri 420 nm, kjer je ekstincijski koeficient, $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

1) REAGENTI:

a) 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)

$c = 1 \text{ mM}$

$V = 100 \text{ mL}$

- hranimo v hladilniku, zavito v folijo

b) Natrijev acetatni pufer

$c = 100 \text{ mM}$

$V = 100 \text{ mL}$

$\text{pH} = 5$

2) POSTOPEK:

Podane volumne (v mL) posameznih reagentov odpipetirajte v mikrocentrifugirke:

	<u>Vzorec</u>	<u>Blank</u>
1 mM ABTS	0,40	0,40
100 mM natrijev acetatni pufer, pH = 5	1,20	2,00
encim (vzorec)	0,80	-----

- določene količine substratov odpipetirajte v epruveto,
- encim (vzorec) dodamo tik pred meritvijo na spektrofotometru,
- absorbance merimo na spektrofotometru pri valovni dolžini $\lambda = 420 \text{ nm}$,
- zasledujemo kinetiko 1 min (beleženje absorbance vsakih 10 s),
- izris premice na spektrofotometru po končani meritvi:

- linearna premica: OK

- nelinearna krivulja: pomeni, da je encim porabil ves substrat prej kot v 1 min – preveč encima v raztopini - sledi redčenje encima (v acetatnem pufru).

3) UPORABLJENE ENAČBE:

a) aktivnost encima (U/mL)

$$\frac{U}{mL} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right) \cdot V_{reakcijske\ raztopine} \cdot df}{\varepsilon \cdot V_{vzorca}}$$

Kjer je:

$\Delta A/\Delta t$ - sprememba absorbance v danem časovnem intervalu (min^{-1}),

$V_{reakcijske\ raztopine}$ - volumen reakcijske mešanice (2,4 mL),

df - razredčitveni faktor,

ε - ekstinkcijski koeficient (36 mL/ $\mu\text{mol cm}$),

V_{vzorca} - volumen vzorca (0,8 mL).

b) specifična aktivnost encima (U/mg_{proteinov})

$$\frac{U}{mg_{proteinov}} = \frac{U/mL}{c}$$

Kjer je:

c – koncentracija proteinov (mg/mL).

4) IZRAČUNI:

5) OPAŽANJA:

3. vaja: Določevanje aktivnosti lipaze

PRINCIP:



Pomen kratic:

PNPB = p-nitrofenil butirat

LPL = lipoproteinska lipaza

POGOJI: T = 37 °C, pH = 7,2, A_{400nm}

1) REAGENTI:

- A. 100 mM natrijev fosfatni pufer s 150 mM natrijevim kloridom in 0,5 % (v/v) Triton1 X-100, pH 7,2 pri 37 °C. (Pripravite 100 ml raztopine v deionizirani vodi z uporabo natrijevega fosfata, monobazičnega, brezvodnega, Sigma prod. št. S-0751, natrijevega klorida, Sigma prod. št. S-9625 in Triton1 X-100, Sigma št. X-100. Naravnajte na pH 7,2 pri 37 °C z 1 M NaOH.)
- B. Acetonitril (Acetonitril, Sigma Prod. No. A-3396.)
- C. 50 mM p-nitrofenil butirat (PNPB) (Pripravite 1,0 mL raztopine PNPB, Sigma Prod. No. N-9876, v reagentu B.)
- D. Raztopina encima lipaze (Nemudoma pred uporabo si pripravite raztopino encima (60-70 U/mL) v ohlajenem reagentu A.)

2) POSTOPEK:

Podane volumne (v mL) posameznih reagentov odpipetirajte v mikrocentrifugirke:

	<u>Vzorec</u>	<u>Blank</u>
Reagent A (pufer)	0,90	0,90
Reagent D (raztopina encima)	0,10	0,10

Mešajte pri temperaturi 37 °C. Izmerite absorbanco pri A400 nm.

Nato dodajte:

Reagent C (PNPB)	0,010	-----
Deionizirana voda	-----	0,010

Takoj premešajte in merite kinetiko pri A400 nm 5 minut. Določite maksimalno A400nm/minuto za vzorec in blank.

3) UPORABLJENE ENAČBE:**a) aktivnost encima (U/mL)**

$$\frac{U}{mL} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{400\text{ nm}}}{\text{min}}\right)_{\text{vzorec}} - \left(\frac{\Delta A_{400\text{ nm}}}{\text{min}}\right)_{\text{blank}} \cdot 1,01 \cdot df}{0,0148 \cdot 0,1}$$

Kjer je:

1,01 = celotni volumen vzorca za analizo,

df = dilucijski faktor,

0,0148 = mikromolarni ekstincijski faktor za p-nitrofenol pri 400 nm,

0,1 = volumen dodanega encima (v mL).

b) specifična aktivnost encima (U/mg_{proteinov})

$$\frac{U}{mg_{\text{proteinov}}} = \frac{U/mL}{c}$$

Kjer je:

c – koncentracija proteinov (mg/mL).

DEFINICIJA ENOTE:

Ena enota bo sprostita 1,0 nanomol (10⁻⁹ molov) p-nitrofenola na minuto pri pH 7,2 in 37 °C z uporabo p-nitrofenil butirata kot substrata.

4) IZRAČUNI:

5) OPAŽANJA:

4. vaja: Določevanje aktivnosti hrenove peroksidaze

Za določevanje aktivnosti hrenove peroksidaze se uporabljata substrata 4-aminoantipiridin in H₂O₂.

1) REAGENTI:

a) 4-aminoantipiridin (4-APP)

- 1) zatehtajte 810 mg fenola in 25 mg 4-APP, dodajte 40 mL milli-Q vode, zmešajte
- 2) dodajte 10 mL milli-Q vode

b) H₂O₂

- 1) pripravite, 99 mL of milliQ vode v katero dodate 1 mL H₂O₂, zmešajte
- 2) pripravite 49 mL PBS (pH=7), dodajte 1 mL H₂O₂ iz koraka 1).

c) PBS pufer

$$V = 0,5 \text{ L}$$

$$c = 0,2 \text{ M}$$

$$M (\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}) = 137,99 \text{ g/mol}$$

$$\text{pH} = 7$$

d) hrenova peroksidaza (vzorec)

2) POSTOPEK:

Podane volumne (v mL) posameznih reagentov odpipetirajte v mikrocentrifugirke:

	<u>Vzorec</u>	<u>Blank</u>
4-APP	1,4	1,4
H ₂ O ₂	1,5	1,5
PBS	0,1	0,6
VZOREC	0,5	-

Določite kinetiko pri 510 nm, 4 min.

3) UPORABLJENE ENAČBE:

a) Specifična aktivnost encima (U/mg)

$$A = \frac{\Delta A_{510 \text{ nm}}}{\varepsilon \cdot V \cdot c}$$

Kjer je:

A - specifična aktivnost encima v U/mg_{encima},

$\Delta A_{510 \text{ nm}}$ - sprememba absorbanca,

ε - ekstinkcijski koeficient ($6,58 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

V - volumen celotnega vzorca (3,5 mL),

c - koncentracija proteinov (mg/mL).

Izračun za spremembo absorbanca $\Delta A_{510 \text{ nm}}$

$$A = \frac{\Delta A_{510 \text{ nm}, 4 \text{ min}} - \Delta A_{510 \text{ nm}, 0 \text{ min}}}{4}$$

4) IZRAČUNI:

5) OPAŽANJA: