

3. ENZYMY

3.1. Przykłady oznaczeń niektórych enzymów

3.1.1. Ogólne właściwości i systematyka enzymów

Enzymy – biokatalizatory wytwarzane przez komórki – przyspieszają przebieg reakcji termodynamicznie możliwych poprzez obniżanie energii aktywacji. Szybkość reakcji enzymatycznej (V) zależy od stężenia enzymu i substratu, stężenia aktywatorów i inhibitorów oraz temperatury i pH. Mierzymy ją najczęściej przyrostem stężenia produktu lub ubytkiem stężenia substratu w jednostce czasu. W warunkach optymalnych przy nadmiarze substratu i stałym stężeniu enzymu szybkość jest wielkością stałą, a wykres zależności szybkości od czasu odpowiada linii prostej (reakcja zerowego rzędu). W miarę przebiegu reakcji jej szybkość z wielu powodów spada i dlatego wyznacza się szybkość początkową reakcji (V_0) dokonując pomiaru po możliwie krótkiej inkubacji enzymu z substratem. W takim przypadku szybkość reakcji jest proporcjonalna do ilości enzymu i może służyć do pomiaru jego zawartości w próbce.

Enzymy należą do białek o masach cząsteczkowych w zakresie 10^4 – 10^6 daltonów. Niektóre z nich to białka proste zbudowane wyłącznie z aminokwasów (np. trypsyna); inne wymagają dla procesu katalizy składnika niebiałkowego. Enzym jako całość nazywamy holoenzymem, jego część białkową – apoenzymem, a część niebiałkową, uczestniczącą w reakcji – grupą prostetyczną lub koenzymem.

Klasyfikacja oraz nomenklatura enzymów są koordynowane przez Komitet Nomenklatury Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (z ang. NC-IUBMB). Według przyjętych zasad, enzymy i katalizowane reakcje podzielono na sześć klas głównych:

1. Oksydoreduktazy – katalizują odwracalne reakcje utleniania i redukcji, a więc przemiany związane z przeniesieniem protonów i elektronów.
2. Transferazy – katalizują odwracalne reakcje przeniesienia grup funkcyjnych z donora na akceptor.
3. Hydrolazy – katalizują nieodwracalne reakcje hydrolizy, a więc rozpadu wiązań z jednoczesnym przyłączeniem się jednej cząsteczki wody na każde wiązanie ulegające rozpadowi.
4. Liazy – katalizują niehydrolityczny rozpad wiązań (bez pobrania i wydzielania ubocznych produktów), niektóre reakcje są odwracalne.
5. Izomerazy – katalizują reakcje przekształceń strukturalnych w obrębie cząsteczki – reakcje odwracalne.
6. Ligazy czyli syntetazy – katalizują syntezę trwałych wiązań kowalencyjnych (np. C-C, C-N, C-S, C-O) z wykorzystaniem wiązań wysokoenergetycznych ATP.

W obrębie tych sześciu klas głównych wyróżnia się podklasy i podpodklasy, które bliżej charakteryzują daną reakcję enzymatyczną. Zgodnie z przyjętą klasyfikacją, każdy enzym jest charakteryzowany przez 4 liczby, z których pierwsza oznacza przynależność enzymu do jednej z klas głównych, druga i trzecia określają przynależność do odpowiedniej podklasy i podpodklasy, czwarta zaś – kolejny numer enzymu w obrębie podpodklasy. Przykładowo, trypsyna sklasyfikowana pod numerem EC 3.4.21.4, to enzym z klasy hydrolaz (cyfra 3), podklasy hydrolaz wiązań peptydowych (cyfra 4 na drugiej pozycji), podpodklasy endopeptydaz serynowych (liczba 21) i numerze porządkowym 4 (ostatnia cyfra).

Przynależność enzymu do określonej klasy głównej, a więc typ katalizowanej reakcji oraz nazwa substratu, na który działa dany enzym, znajdują odbicie w systematycznym nazewnictwie enzymów. Każda nazwa złożona jest z dwóch części, z których pierwsza określa typ katalizowanej reakcji (np. oksydoreduktaza), druga zaś wskazuje substrat na który działa dany enzym. Nazwy systematyczne, chociaż jednoznaczne, np. oksydoreduktaza nadtlenek wodoru : nadtlenek wodoru, są z reguły długie, a przez to niewygodne i dlatego w dalszym ciągu często stosuje się nazwy potoczne – w tym przypadku katalaza.

Niektóre enzymy produkowane są w formie nieaktywnej jako tzw. proenzymy (zymogeny) np. trypsyna jako trypsynogen. Uaktywnienie proenzymów zachodzi często na drodze ograniczonej proteolizy, dzięki czemu dochodzi do uformowania się centrum aktywnego enzymu lub jego odsłonięcia. Uaktywnienie enzymów zachodzi pod wpływem odpowiednich aktywatorów lub też pod wpływem aktywnych już części cząsteczek tego enzymu (autoaktywacja).

Niektóre enzymy występują w organizmie w kilku formach różniących się właściwościami fizykochemicznymi. Czasem wynika to z obecności w cząsteczce enzymu dodatkowych składników obdarzonych ładunkiem, np. reszt kwasu sjałowego (mikroheterogeniczność białek). Niekiedy jednak dany enzym występuje w poszczególnych tkankach w postaci form różniących się składem aminokwasowym, powstających w wyniku transkrypcji osobnych genów, utworzonych w wyniku duplikacji i mutacji jednego pierwotnego genu. Te genetycznie uwarunkowane odmiany jednego enzymu nazywamy izoenzymami. Z reguły dotyczy to enzymów oligomerycznych zbudowanych z kilku łańcuchów polipeptydowych np. aldolazy. W niektórych przypadkach izoenzymy mogą reprezentować adaptację biochemiczną np. dehydrogenaza mleczanowa mięśni szkieletowych łatwiej redukuje kwas pirogronowy niż analogiczny enzym z mięśnia sercowego. W pewnych stanach patologicznych obraz izoenzymów surowicy krwi ulega charakterystycznej zmianie, co może mieć znaczenie w diagnostyce klinicznej.

ZAGADNIENIA DO OPRACOWANIA:

- Budowa chemiczna enzymów, enzymy mono- i oligomeryczne, kompleksy wieloenzymowe, definicje oraz przykłady takich pojęć jak holoenzym, apoenzym, koenzym, grupa prostetyczna, izoenzym, proenzym, zymogen, marker enzymatyczny organelli komórkowych.
- Zasady klasyfikacji oraz nomenklatury enzymów.
- Ogólny mechanizm działania enzymów, podstawy termodynamiczne i kinetyczne biokatalizy, definicja oraz znaczenie szybkości początkowej reakcji enzymatycznej.
- Zasady wszystkich wykonywanych na ćwiczeniach oznaczeń.

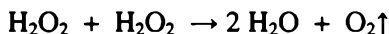
LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA:

- *Elementy enzymologii*. Witwicki J., Ardelt W. (red.), PWN, Warszawa 1984.

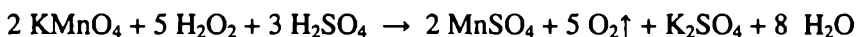
3.1.2. Oznaczanie aktywności katalazy (EC 1.11.1.6) i wyznaczenie szybkości początkowej reakcji enzymatycznej

ZASADA:

Katalaza czyli oksydoreduktaza nadtlenek wodoru : nadtlenek wodoru (EC 1.11.1.6) jest hemoproteiną zawierającą 4 grupy hemowe. Rozkłada H_2O_2 według reakcji:



Oznaczanie aktywności tego enzymu można przeprowadzić m.in. metodą miareczkową. Polega ona na oznaczeniu ubytku substratu czyli H_2O_2 , przez miareczkowanie manganometryczne próbek pobieranych z mieszaniny inkubacyjnej, w której źródłem H_2O_2 jest nadboran sodu. W miarę ubytku substratu szybkość reakcji spada, należy więc stosować enzym odpowiednio rozcieńczony oraz wyznaczyć szybkość początkową reakcji. Miareczkowanie H_2O_2 nadmanganianem przebiega według równania:



Na tej podstawie można wyliczyć, że 1 ml 0,02 M $KMnO_4$ zużytego do miareczkowania odpowiada 50 μ molom H_2O_2 obecnym w mieszaninie reakcyjnej. Źródłem katalazy jest świeżo przygotowany hemolizat krwinek czerwonych. Szybkość początkową reakcji można wyznaczyć graficznie z wykresu przedstawiającego ilość rozłożonego H_2O_2 w zależności od czasu. W tym celu należy przeprowadzić styczną do narysowanej krzywej rozpoczynającej się w punkcie 0 i wyznaczyć szybkość początkową, której miarą jest tangens kąta, jaki tworzy styczna z osią odciętych.

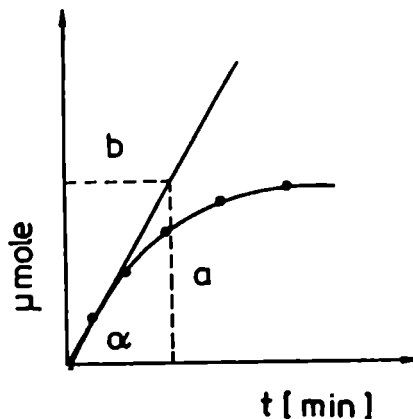
WYKONANIE:

Przygotować serię 6 zlewek (o pojemności około 25 – 50 ml) i do każdej odpipetować po 2 ml 1 M H_2SO_4 z dodatkiem 1% $MnSO_4$ (katalizator). W oddzielnej zlewce o pojemności 100 ml przygotować mieszaninę reakcyjną: 1,5 ml hemolizatu krwinek (rozcieńczonego według wskazówek asystenta 0,1 M buforem fosforanowym pH 7,4), 15 ml 0,1 M buforu fosforanowego i 15 ml 0,1 M nadboranu sodu. Wymieszać i natychmiast pobrać 5 ml do pierwszej z wcześniej przygotowanych zlewek z kwasem. Pozostałość mieszaniny inkubować w temperaturze pokojowej i co 3 min pobierać 5 ml do kolejnej zlewki z przygotowanej serii z kwasem. Zawartość zlewek miareczkować biuretą napełnioną 0,02 M $KMnO_4$. **UWAGA:** enzym użyty w doświadczeniu powinien być tak rozcieńczony, aby różnica ilości $KMnO_4$ zużytego na dwa kolejne miareczkowania w odstępach 3 minutowych nie przekraczała 2 ml.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Obliczyć liczbę mikromoli H_2O_2 rozłożonego przez enzym podczas inkubacji i wyniki przedstawić w postaci wykresu (na osi odciętych – czas w minutach, na osi rzędnych – mikromole rozłożonego H_2O_2). Z wykresu odczytać szybkość początkową.

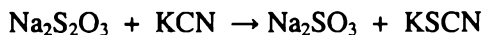
$$V_o = \operatorname{tg} \alpha = \frac{a (\mu\text{mole})}{b (\text{czas})}$$



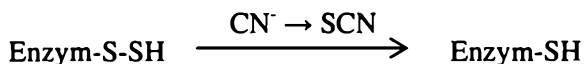
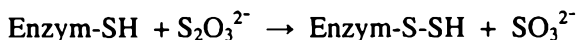
3.1.3. Oznaczanie aktywności rodanazy (EC 2.8.1.1)

ZASADA:

Rodanaza (transsulfuraza tiosiarczanu) jest wygodnym enzymatycznym znacznikiem mitochondriów wątroby. W centrum aktywnym tego enzymu znajduje się reszta cysteiny. Rodanaza katalizuje przeniesienie atomu siarki na jon CN^- zgodnie z reakcją:



Jon rodankowy, będący produktem reakcji, można oznaczyć ilościowo w reakcji z jonami żelaza (III):



WYKONANIE:

Do zlewki o pojemności około 25 ml odmierzyć 0,5 ml rozcieńczonego (według wskazówek asystenta) enzymu (homogenat wątroby szczura), dodać 1 ml 0,125 M tiosiarczanu i 0,5 ml 0,2 M KH_2PO_4 , wymieszać, a następnie ostrożnie (**UWAGA:** silna trucizna!) dodać 0,5 ml 0,25 M roztworu cyjanku potasu KCN. Wymieszać ponownie i inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 min. Dodać 0,5 ml formaliny, wytrząsnąć i dodać 2,5 ml odczynnika żelazowego. Próbkę ślepą sporządzić identycznie, z tą różnicą, że formalinę (hamującą reakcję enzymatyczną poprzez denaturację białka) należy dodać przed KCN. Jeżeli próbki są żółte zmierzyć ich absorbancję przy 460 nm wobec H_2O bez rozcieńczenia. Jeżeli próbki są czerwone rozcieńczyć je przed pomiarem absorbancji przez dodanie 25 ml destylowanej H_2O . **UWAGA:** próbki mętne (zawierające duże ilości białka) należy przesączyć przez sączki bibułowe po rozcieńczeniu. W podanych warunkach w próbkach nierozcień-

czonych 1 μmol SCN^- daje absorbancję 0,8 a w próbkach rozcieńczonych 1 μmol SCN^- daje absorbancję 0,11.

UWAGA: należy zachować dużą ostrożność przy pipetowaniu roztworu cyjanku potasu. Użyć pipety automatycznej lub nasadki na pipetę szklaną, a próbki wylewać do specjalnie przygotowanego naczynia zawierającego roztwór zasady, nie do zlewu!

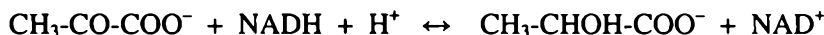
OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Obliczyć (z proporcji) ilość mikromoli produktu uwolnionego w ciągu 1 min przez enzym zawarty w 1 ml nierozcieńzonego homogenatu wątroby szczura. Przeliczenie takie jest w tym przypadku możliwe, bowiem z wcześniejszych doświadczeń wynika, że w ciągu pierwszych 5 minut zachowany jest prostoliniowy charakter zależności przyrostu stężenia produktu od czasu.

3.1.4. Oznaczanie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (EC 1.1.2.3)

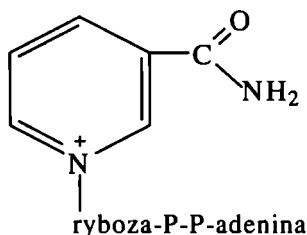
ZASADA:

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) katalizuje przemianę pirogronianu w mleczan oraz reakcję odwrotną, zależnie od stężeń reagentów.

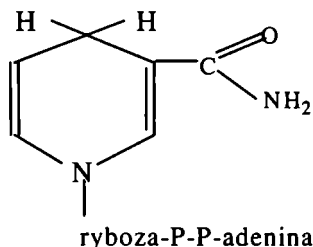


Enzym ten występuje we wszystkich komórkach, a szczególnie obficie w mięśniach szkieletowych, wątrobie i mięśniu sercowym. LDH izolowane z różnych typów tkanek katalizują wprawdzie identyczne reakcje, lecz enzymy te różnią się właściwościami fizykochemicznymi, stanowiąc klasyczny przykład izoenzymów. Jedną z metod oznaczania aktywności LDH jest metoda spektrofotometryczna. W reakcji pirogronianu z NADH katalizowanej przez LDH dochodzi do spadku absorbancji przy 340 nm spowodowanego ubytkiem NADH. Forma utleniona NAD^+ wykazuje pasmo absorpcyjne przy 260 nm, natomiast forma zredukowana posiada dodatkowe pasmo przy 340 nm. Szybkość reakcji tworzenia mleczanu i NAD^+ (a tym samym aktywność enzymu) można więc mierzyć śledząc obniżenie wartości absorbancji przy 340 nm:

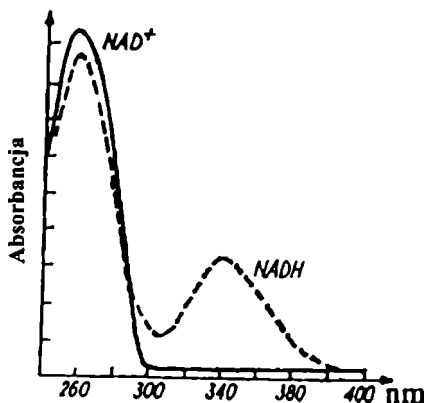
forma utleniona (NAD^+):



forma zredukowana (NADH):



Widma absorpcyjne NAD⁺ oraz NADH:



WYKONANIE:

Nastawić spektrofotometr na 340 nm i używając kwarcowej kuwety dokonać zerowania względem wody destylowanej. W celu oznaczenia aktywności LDH odmierzyć bezpośrednio do kwarcowej kuwety pomiarowej 3 ml 0,05 M buforu fosforanowego pH 7,5 zawierającego 3 mM pirogronian, po czym dodać 0,05 ml 9 mM NADH i 0,1 ml rozcieńczonego według wskazówek asystenta homogenatu wątroby. Przy stosowaniu kuwety kwarcowej z przewężeniem, objętości roztworów zmniejszyć o połowę. Natychmiast po zmieszaniu zmierzyć absorbancję przy 340 nm i dokonywać dalszych pomiarów w odstępach 30 sekundowych przez 5 min.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Sporządzić wykres spadku absorbancji (A) w czasie, wykreślić styczną do krzywej i odczytać wartość A po 1 min. Aktywność enzymu wyrazić w μmol ach przetworzonego substratu (NADH) w ciągu 1 min przez enzym zawarty w 1 ml nierozcieńczonego homogenatu wątroby. Do obliczeń przyjąć, że absorbancja roztworu zawierającego 1 μmol NADH w 3,15 ml (objętość mieszaniny inkubacyjnej) wynosi 1,97.

3.1.5. Oznaczenie aktywności trypsyny (EC 3.4.21.4)

ZASADA:

Trypsyna jest enzymem proteolitycznym wytwarzanym w trzustce. Optimum działania tego enzymu mieści się w zakresie pH 7,6–8,0. Enzym ten hydrolizuje wiązania peptydowe po karboksylowej stronie reszt lizyny i argininy. Po strawieniu białka pojawiają się wolne grupy karboksylowe i aminowe, które można oznaczyć metodą miareczkową (np. przyrost ilości grup aminowych metodą formolową Sørensen).

WYKONANIE:

Do kolbki o objętości 50 ml odmierzyć 16 ml 4% roztworu żelatyny i 4 ml roztworu trypsyny (2,4 mg/10 ml 0,5% Na₂CO₃). Natychmiast po zmieszaniu pobrać 2,5 ml mieszaniny i przenieść do kolbki zawierającej 5 ml zobojętnionej formaliny (próbka kontrolna). Pozostałość inkubować w temperaturze 37°C i pobierać analogiczne

próbki po 5, 10, 20, 40 i 60 min. Wszystkie próbki miareczkować 0,02 M NaOH z mikrobiurety, w obecności fenoloftaleiny.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Uwzględniając wynik miareczkowania próby kontrolnej, wyliczyć liczbę mikromoli uwolnionych grup aminowych po określonym czasie trawienia białka. Należy pamiętać, że 1 ml 0,02 M NaOH użytego do miareczkowania odpowiada 20 μ molom grup aminowych. Uzyskane wyniki przedstawić w postaci wykresu. Wykreślić styczną do krzywej i wyznaczyć szybkość początkową V_0 (patrz oznaczenie aktywności katalazy).

ODCZYNNIKI:

Homogenat wątroby szczura: wątrobę odpłukać od krwi zimnym 0,9% NaCl i pociąć dokładnie nożyczkami. Podzielić na 5 części i homogenizować z 4 objętościami wychłodzonego 0,9% NaCl w homogenizatorze Potter-Elvehjema (teflon-szkło) przez około 2 min przy 1000 obr./min. Wszystkie zabiegi wykonywać przy chłodzeniu lodem. Homogenat rozcieńczyć dwukrotnie i odwirować przez 10 min przy 2500 obr./min w wirówce K-23 w temperaturze +4°C. Osad odrzucić, a nadsącz wirować w plastikowych probówkach w wirówce K-24 przy 8000 obr./min przez 15 min w temperaturze 4°C. Nadsącz zamrozić w kilku porcjach.

Hemolizat krwinek czerwonych: odwirować 2,5 ml krwi pobranej do cytrynianu, osad przemyć 2 razy 5 ml 0,9% NaCl, a następnie do osadu dodać 7,5 ml wody destylowanej. Wytrząsnąć i ponownie odwirować na nasadce szybkoobrotowej w celu usunięcia błon erytrocytów.

Trypsyna (2,4 mg/10 ml 0,5% Na_2CO_3); 0,1% bufor fosforanowy pH 7,4; 0,1 M nadboran sodu ($\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1,54 g/100 ml, przygotować bezpośrednio przed użyciem; 1 M H_2SO_4 ; 0,02 M KMnO_4 ; 1% MnSO_4 ; 0,125 M tiosiarczan sodu; 0,25 M KCN; formalina (38% roztwór aldehydu mrówkowego); odczynnik żelazowy (50 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ + 100 ml 65% HNO_3 (stężony) + woda destylowana do 500 ml). Jeżeli brak azotanu żelaza to można go zastąpić (60 g $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 100 ml 65% HNO_3 + woda destylowana do 500 ml); 0,05 M bufor fosforanowy pH 7,5 zawierający 3 mM pirogronian sodu (14,8 ml 0,05 M KH_2PO_4 + 85,2 ml 0,05 M Na_2HPO_4 + 3,3 mg pirogronianu sodu); 9 mM NADH (6,3 mg NADH rozpuścić w 1 ml 0,01 M NaOH); 0,1 M bufor maleinianowy pH 6,5; substrat do oznaczania glukozy-6-fosfatazy: glukozy-6-fosforan (odważyć 30 mg G-6-PNa₂ i rozpuścić w 1 ml buforu maleinianowego). Jeżeli jest dostępna tylko sól barowa G-6-P, należy substrat przygotować następująco: do 260 mg G-6-PBa \cdot 7 H₂O w probówce wirówkowej dodać 2 ml H₂O i 1 kroplę 1 M HCl do rozpuszczenia. Następnie wsypać 72 mg bezwodnego Na₂SO₄ i powstały osad odwirować. Przebrać supernatant, doprowadzić pH do 6,5 i uzupełnić wodą do 5 ml. Przechowywać w zamrażarce. 6% TCA; 5 M H_2SO_4 ; 2,5% molibdenian amonu (2,5 mg molibdenianu amonu rozpuścić w 20 ml H₂O, przenieść do kolby miarowej na 100 ml zawierającej 5 ml 5 M H_2SO_4 i uzupełnić H₂O). Roztworu nie używać po wypadnięciu osadu. 0,25% eikonogen (kwas 1-amino-2-naftolo-4 (lub 6) sulfonowy) — (do około 90 ml wody o temperaturze 90°C dodać 15 g Na₂S₂O₅, po rozpuszczeniu dodać 25 g eikonogenu i wytrząsać do uzyskania zawiesiny. Dodać 1 g Na₂SO₃, jeżeli eikonogen się nie rozpuści, można jeszcze dodać Na₂SO₃). Przechowywać w ciemnej butelce; roztwór trwały kilka tygodni. Substrat do oznaczania fosfatazy alkalicznej; 60% TCA; 4% roztwór żelatyny; formalina zobojętniona wobec fenoloftaleiny; 0,02 M roztwór NaOH.

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Homogenizator, wirówka K-23, wirówka K-24, spektrofotometr.

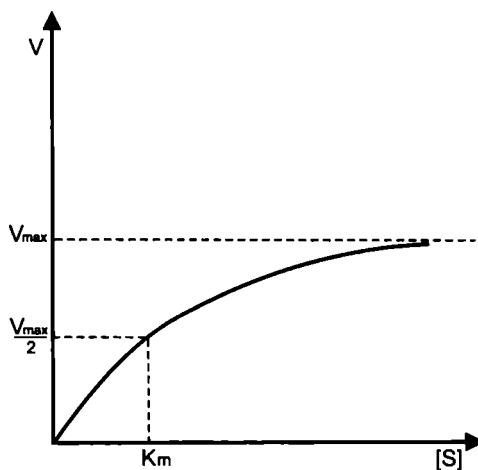
3.2. Badanie kinetyki reakcji enzymatycznej

3.2.1. Wprowadzenie do kinetyki reakcji enzymatycznych

Znajomość kinetyki reakcji enzymatycznych umożliwia zrozumienie roli, jaką spełniają enzymy w procesach metabolicznych. Według historycznych zaleceń Komisji Enzymowej z 1961 r., jednostka standardowa enzymu (U) odpowiada takiej jego ilości, która katalizuje przemianę 1 mikromola substratu w ciągu 1 min w warunkach optymalnych (miano: $\mu\text{mol}/\text{min}$). Natomiast stopień czystości preparatów enzymatycznych określa aktywność właściwa, tzn. liczba jednostek standardowych przypadająca na 1 mg białka preparatu (U/mg). Dla maksymalnie oczyszczonych preparatów enzymu można wyznaczyć aktywność molekularną, tj. liczbę cząsteczek substratu przekształconych w czasie 1 min przez 1 cząsteczkę enzymu w warunkach optymalnych. Aktywność molekularną wyraża się w takich samych jednostkach co stałą katalityczną – k_{cat} (patrz dalej).

W 1972 r. Komisja Enzymowa wprowadziła zmiany w definicji jednostki enzymatycznej. Jeden katal (kat) jest to taka aktywność enzymu, która przekształca 1 mol substratu w ciągu 1 sekundy. Jego mianem jest mol/s, a pochodnymi są mikrokatal i nanokatal. Aktywność właściwą wyraża się w mikrokatalach na kilogram białka ($\mu\text{kat}/\text{kg}$).

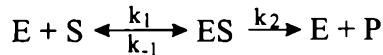
Zależność między szybkością reakcji enzymatycznej a stężeniem substratu przedstawiona graficznie ma najczęściej kształt wycinka równoramiennej hiperboli (z wyjątkiem enzymów allosterycznych, dających często krzywe sigmoidalne):



Wykres zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu wg Michaelisa-Menten

W miarę nasycania enzymu substratem szybkość reakcji enzymatycznej zbliża się asymptotycznie do wartości granicznej, nazywanej szybkością maksymalną (V_{max}).

Dla reakcji enzymatycznej przebiegającej wg równania:

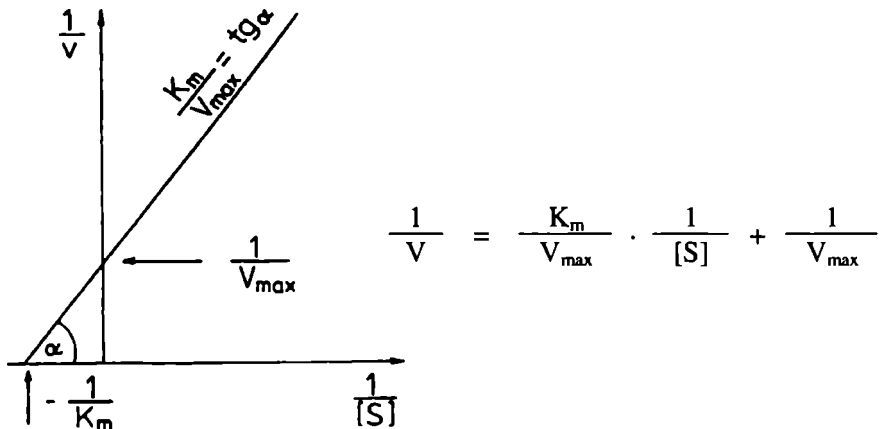


stosunek stałych prędkości $(k_{-1}+k_2)/k_1$ jest miarą powinowactwa enzymu do substratu. Jest on stały i określany mianem stałej Michaelisa K_m . Liczbowo jest ona równa takiemu stężeniu substratu (S), przy którym szybkość reakcji jest równa połowie szybkości maksymalnej (patrz rysunek wyżej). Natomiast stała katalityczna (k_{cat}) jest stosunkiem liczbowym szybkości maksymalnej do stężenia enzymu wyrażonego np. w mikromolach, zaś mianem k_{cat} jest odwrotność czasu wyrażona w sekundach:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{\mu\text{mole enzymu}} = \frac{\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}}{\mu\text{mol}} = \text{s}^{-1}$$

Stała k_{cat} (a także aktywność molekularna) określa liczbowo reaktywność enzymu lub inaczej, jego zdolności katalityczne i wyraża liczbę cząsteczek substratu, które przekształca 1 cząsteczka enzymu w jednostce czasu w warunkach pełnego wysycenia enzymu substratem. Jednakże rzeczywistą miarą efektywności biologicznej enzymu jest stosunek k_{cat}/K_m . Wartość liczbowa tego stosunku pozwala porównać skuteczność działania różnych enzymów przy niewielkich stężeniach substratów, a więc w warunkach panujących często w żywym organizmie.

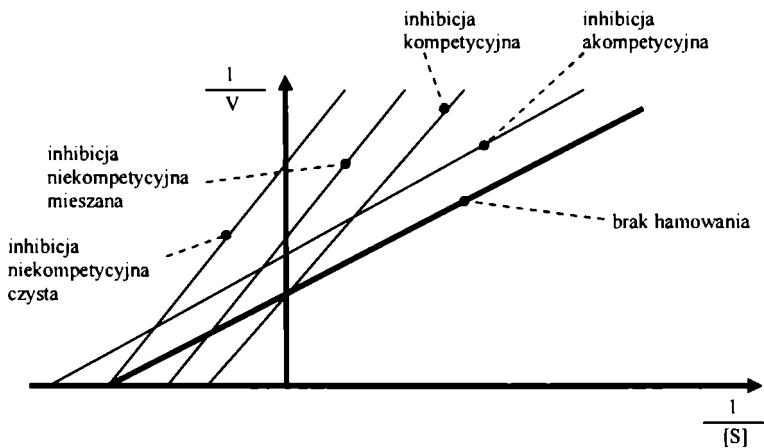
Rozważając wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji enzymatycznej należy uwzględnić liczbę substratów uczestniczących w danej reakcji. Jeżeli w reakcji bierze udział jeden substrat, zależność między jego stężeniem a szybkością reakcji opisuje np. równanie Michaelisa-Menten, zaś graficznie przedstawiają krzywe Michaelisa-Menten i Lineweavera-Burka. Wykres zależności odwrotności szybkości reakcji enzymatycznej od odwrotności stężenia substratu według Lineweavera-Burka przedstawia się następująco:



W reakcjach enzymatycznych w organizmie biorą udział często dwa lub więcej substratów, np. w wielu reakcjach katalizowanych przez transferazy. W tego typu katalizie wyróżnia się dwa typy mechanizmów reakcji: sekwencyjny i niesekwencyjny (tzw. ping-pong). Podziału dokonano w zależności od tego czy substraty muszą być

związane z enzymem zanim pierwszy produkt zostanie uwolniony czy też niezależnie. Kinetyka tych reakcji jest bardziej złożona aniżeli kinetyka reakcji jednosubstratowych.

Inhibitorami enzymów nazywamy swoiste czynniki hamujące przebieg określonych reakcji enzymatycznych. Działanie ich może być nieodwracalne (inaktywatory enzymów) lub odwracalne, jeżeli kompleks enzym-inhibitor ma zdolność do dysocjacji. Inhibitory odwracalne mogą się wiązać w miejscu aktywnym enzymu lub poza nim. Te, które wiążą się w centrum aktywnym enzymu są nazywane inhibitorami kompetycyjnymi (współzawodniczącymi), bo konkurują z substratem o miejsce wiążące enzymu. Ich działanie ulega osłabieniu w miarę wzrostu stężenia substratu, zwiększa się zatem wartość K_m , która w obecności inhibitora staje się wówczas tzw. pozorną stałą Michaelisa K_{mapp} . Prędkość maksymalna reakcji pozostaje taka sama chociaż do jej osiągnięcia będzie oczywiście wymagana większa ilość substratu aby zniwelować działanie inhibitora. Natomiast inhibitory wiążące się z enzymem poza centrum aktywnym określa się jako niekompetycyjne (niewspółzawodniczące) lub akompetycyjne (gdy inhibitor może się wiązać wyłącznie z kompleksem enzym-substrat). Inhibicja niekompetycyjna może być czysta (gdy związanie inhibitora nie wpływa na wiązanie substratu do enzymu, rzadko występuje) lub mieszana (częstszy przypadek, gdy związanie inhibitora wpływa na siłę wiązania substratu z centrum aktywnym enzymu). W przypadku inhibicji niekompetycyjnej czystej K_m pozostaje niezmienna, zmniejsza się tylko V_{max} , zaś w inhibicji niekompetycyjnej mieszanej zmniejsza się wartość V_{max} a rośnie lub maleje wartość pozornej stałej Michaelisa K_{mapp} . Natomiast w inhibicji akompetycyjnej maleją zarówno V_{max} jak i wartość pozornej stałej Michaelisa K_{mapp} . Graficzna ilustracja tych zależności w ujęciu Lineweavera – Burka przedstawia się następująco:



Osobną klasę inhibitorów stanowią ujemne efekторы allosteryczne, lecz kinetyka reakcji allosterycznych nie będzie tutaj omawiana.

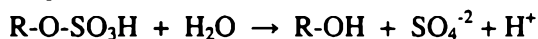
- Kinetyka reakcji enzymatycznych w ujęciu Michaelisa-Mentena oraz Linewe-avera-Burka.
- Kinetyka hamowania reakcji enzymatycznych, typy, przykłady oraz znaczenie fizjologiczne inhibitorów enzymatycznych.
- Arylosulfatazy - katalizowane reakcje, rola w organizmie, oznaczanie aktywności.
- Zasady wszystkich wykonywanych na ćwiczeniach oznaczeń.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA:

- *Elementy enzymologii*. Witwicki J., Ardelt W. (red.), PWN, Warszawa 1984.
- Ługowska A., Tylki-Szymańska A., Arylosulfataza a efekty niedoboru. *Postępy Biochemii*, 42 (1996) 284.
- *Biochemistry* (j. ang.). Garrett RH., Grisham CM. (red.), Belmont 2005.

3.2.2. Wyznaczanie stałej Michaelisa dla arylosulfatazy A (EC 3.1.6.1)

Arylosulfatazy są enzymami katalizującymi *in vitro* hydrolizę estrów siarczanowych fenoli według reakcji:



Opierając się na specyficzności substratowej, wpływie inhibitorów i lokalizacji subkomórkowej dokonano podziału arylosulfataz na dwa typy, I i II. Enzymy typu I wykazują optimum działania w środowisku obojętnym lub słabo zasadowym. Charakteryzuje je mała specyficzność substratowa, a ich aktywność enzymatyczna jest hamowana przez cyjanki. U ssaków nazwano te enzymy arylosulfatazą C i są one znacznikami frakcji mikrosomowej. Arylosulfatazy typu II charakteryzują się optimum działania leżącym w zakresie kwaśnym. Hamowane są przez jony siarczanowe i fosforanowe i cechuje je wysoka aktywność wobec siarczanu *p*-nitrokatecholu (NCS). Należą do hydrolaz lizosomowych. Dzieli się je na arylosulfatazę A i B. Enzymy te różnią się masą cząsteczkową, optimum pH i powinowactwem do substratu. Stała Michaelisa wobec NCS jako substratu wynosi odpowiednio dla arylosulfatazy z wątroby ludzkiej 1,54 mM, z wątroby wołowej 0,47 mM, z wątroby szczura 0,84 mM. Obecność w środowisku reakcji inhibitorów kompetycyjnych sprawia, że wartość pozornej stałej Michaelisa K_{mapp} podnosi się do wartości około 5–6 mM.

Arylosulfataza A jest kwaśną glikoproteiną o dużej zawartości reszt kwasu glutaminowego i asparaginowego oraz proliny. Centrum aktywne zawiera reszty histydyny oraz co najmniej dwie reszty argininy. Naturalnym substratem dla tego enzymu jest m.in. siarczan cerebrozydu – ważny składnik mieliny. Deficyt aktywności arylosulfatazy A prowadzi do spichrzania siarczanu cerebrozydu głównie w mielinie ośrodkowego układu nerwowego i nerwów obwodowych, co prowadzi do demielini-

zacji a w konsekwencji do zaburzeń neurologicznych z demencją włącznie (leukodystrofia metachromatyczna).

Kinetyka reakcji katalizowanych przez arylosulfatazę A, szczególnie hydrolizy NCS wyraża się nietypową tzw. anomalną zależnością od stężenia enzymu i czasu trwania reakcji. Anomalną kinetykę wynikającą z autoinaktywacji można częściowo odwrócić wprowadzając do środowiska inhibitory kompetycyjne takie jak np. jony SO_4^{2-} .

Wyznaczanie K_m polega na:

1. Wykreśleniu krzywych kinetycznych przyrostu produktu reakcji enzymatycznej w czasie inkubacji dla kilku różnych stężeń substratu.
2. Graficznym znalezieniu szybkości początkowych.
3. Sporządzeniu wykresu zależności między odwrotnością szybkości początkowych a odwrotnością stężenia substratu (wykres Lineweavera-Burka).

ZASADA:

Arylosulfatazy hydrolizują wiązania estrowe syntetycznych estrów siarczanowych fenoli, m.in. siarczanu *p*-nitrokatecholu (2-hydroksy-5-nitrofenylosiarczan). Uwolniony 4-nitrokatechol oznacza się spektrofotometrycznie przy 515 nm.

WYKONANIE A (metoda tradycyjna z użyciem probówek i spektrofotometru):

W probówce typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml sporządzić mieszaninę reakcyjną: 0,6 ml homogenatu wątroby (źródło arylosulfatazy), 0,6 ml substratu i 0,6 ml 0,5 M buforu octanowego pH 5,0 zawierającego 10% NaCl. Mieszaninę wytrząsnąć, inkubować w temperaturze 37°C i po czasie 2, 4, 6, 8 i 10 min pobierać po 300 µl i przetrześć do uprzednio przygotowanych probówek (typu Eppendorf 1,5 ml) zawierających 1 ml 0,5 M NaOH. Po wymieszaniu zmierzyć absorbancję przy 515 nm na spektrofotometrze względem ślepej odczynnikowej. Ślepą odczynnikową przygotować w sposób następujący: 100 µl 0,5 M buforu octanowego pH 5,0 zawierającego 10% NaCl, 100 µl substratu i 100 µl H_2O inkubować w temperaturze 37°C i po 5 min dodać 1 ml 0,5 M NaOH.

Opisane oznaczenie wykonać dla 6 różnych stężeń substratu w zakresie od 20 do 120 mg/10 ml.

WYKONANIE B (metoda z użyciem mikroplitek i czytnika):

Do pięciu kolejnych studzienek polistyrenowej płaskodennej mikroplityki 96-dołkowej odmierzyć po 150 µl 0,5 M NaOH. W probówce typu Eppendorf 1,5 ml sporządzić mieszaninę reakcyjną: 200 µl homogenatu wątroby, 200 µl substratu i 200 µl 0,5 M buforu octanowego pH 5,0 zawierającego 10% NaCl, wytrząsnąć. Inkubować w temp. 37°C i po czasie 2, 4, 6, 8 i 10 min pobierać po 100 µl mieszaniny i przetrześć do przygotowanych uprzednio kolejnych studzienek z NaOH, mieszając zawartość studzienek poprzez pipetowanie. Zmierzyć absorbancję roztworów w studzienkach przy 515 nm na czytniku mikroplitek względem ślepej odczynnikowej umieszczonej w szóstej studzience. Ślepą przygotować następująco: w probówce typu Eppendorf zmieszać ze sobą 50 µl 0,5 M buforu octanowego pH 5,0 zawierającego 10% NaCl, 50 µl odpowiedniego substratu oraz 50 µl H_2O . Całość inkubować w temperaturze 37°C i po 5 min dodać 225 µl 0,5 M NaOH. Po wymieszaniu pobrać 250 µl do studzienki na ślepą odczynnikową.

Opisane oznaczenie wykonać dla 6 różnych stężeń substratu w zakresie od 20 do 120 mg/10 ml.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Dla każdego z użytych stężeń substratu wykreślić krzywe kinetyczne wyrażające zależność przyrostu stężenia produktu od czasu inkubacji. W obliczeniach przyjąć, że w podanych warunkach 1 μ mol nitrokatecholu daje absorbancję 3,2 przy 515 nm. Znaleźć graficznie szybkości początkowe i następnie po sporządzeniu wykresu Lineweavera-Burka wyznaczyć graficznie wartości K_m i V_{max} .

UWAGA: wyjściowe stężenia substratu są podane na butelkach.

ODCZYNNIKI:

Homogenat wątroby szczura, przygotowanie str. 34.

Substrat do oznaczenia arylosulfatazy A: 20, 40, 60, 80 i 120 mg siarczanu *p*-nitrokatecholu w 10 ml 0,5 M buforu octanowego zawierającego 10% NaCl; 0,5 M NaOH; 0,5 M bufor octanowy pH 5,0 z 10% NaCl (100 ml 1 M CH_3COOH + 20 g NaCl + 39 mg $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ uzupełnić do 200 ml wodą i doprowadzić do pH 5,0 1 M NaOH).

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Spektrofotometr lub czytnik mikroplitek 96-dółkowych; płaskodenne polistyrenowe mikroplátky 96-dółkowe.

3.3. Hydrolazy peptydylo-peptydów. Wpływ temperatury oraz inhibitorów na aktywność enzymatyczną

3.3.1. Typy peptydaz oraz struktura i aktywacja peptydaz serynowych

Enzymy rozszczepiające wiązania peptydowe w białkach z przyłączeniem cząsteczki wody nazywamy peptydazami. Należą one do klasy hydrolaz (EC 3.-.-.-), podklasy hydrolaz wiązań peptydowych (EC 3.4.-.-.-). W związku z ciągłym postępowaniem badań klasyfikacja oraz nomenklatura peptydaz często podlegają zmianom i są stosunkowo skomplikowane. Ich podstawowymi kryteriami są: a) rodzaj aminokwasu w centrum aktywnym enzymu, b) liczba, lokalizacja i natura aminokwasów obecnych w sąsiedztwie trawionego wiązania, c) konformacja trawionego łańcucha polipeptydowego. Podobnie jak w przypadku wszystkich enzymów, dla peptydaz obowiązuje nazewnictwo oparte na zaleceniach Komitetu Nomenklaturowego Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (NC-IUBMB). Należy jednak wiedzieć, że niezależnie od tej oficjalnej i zalecanej klasyfikacji, dużą liczbę enzymów proteolitycznych zgrupowano również w bazie danych peptydaz o nazwie MEROPS, która stosuje inne, bardziej filogenetyczne kryteria klasyfikacji. W bazie MEROPS każda peptydaza jest przyporządkowana do określonej rodziny na podstawie statystycznie znamiennych podobieństw w sekwencji aminokwasowej enzymu. Rodziny homologiczne są następnie grupowane w klany.

Peptydazy dzielimy na dwie duże grupy: egzopeptydazy, działające na pierwsze, drugie lub trzecie wiązanie peptydowe i mogące prowadzić reakcję na jednym z obu końców trawionego łańcucha peptydowego oraz endopeptydazy (zwane dawniej proteinazami), działające na dalsze niż trzecie wiązanie peptydowe wewnątrz łańcucha polipeptydowego. Do egzopeptydaz zaliczamy obecnie 9 podpodklas (ze względu na przemieszczanie między podpodklasami ich numeracja nie jest kolejna):

- (EC 3.4.11.-) – aminopeptydazy – uwalniające pojedyncze aminokwasy od wolnego N-końca białka (np. aminopeptydaza leucynowa)
- (EC 3.4.13.-) – dipeptydazy – uwalniające dipeptydy od N-końca białek (np. dipeptydaza E)
- (EC 3.4.14.-) – dipeptydylo-peptydazy oraz tripeptydylo-peptydazy – uwalniające zarówno di- jak i tripeptydy od N-końców białek (np. dipeptydaza I = katepsyna C, dipeptydazy II, III i IV)
- (EC 3.4.15.-) – peptydylo-dipeptydazy – uwalniające dipeptydy od C-końca białek (np. peptydylo dipeptydaza A, zwana również kininazą II albo enzymem konwertującym angiotensynę I)
- (EC 3.4.16.-) – karboksypeptydazy typu serynowego – uwalniają pojedyncze aminokwasy od C-końca białek, zawierają serynę w centrum aktywnym (np. karboksypeptydazy C i D)
- (EC 3.4.17.-) – metalokarboksypeptydazy – uwalniają pojedyncze aminokwasy od C-końca białek, zawierają metal (cynk) w centrum aktywnym (np. karboksypeptydazy A, B, E, M, T i U)
- (EC 3.4.18.-) – karboksypeptydazy typu cysteinowego – uwalniają pojedyncze aminokwasy od C-końca białek, zawierają reaktywną cysteinę w centrum aktywnym (np. katepsyna X)
- (EC 3.4.19.-) – omega-peptydazy – od C-końca białek uwalniają pojedyncze aminokwasy cykliczne lub przyłączone przez wiązanie izopeptydowe (np. peptydazy piroglutamyłowe I i II).

Natomiast endopeptydazy podzielono na 6 podpodklas:

- (EC 3.4.21.-) – endopeptydazy serynowe – zawierają reaktywną resztę seryny w centrum aktywnym, omówiono je szczegółowo w dalszej części niniejszego rozdziału (np. katepsyna G ludzkich neutrofilii, elastaza trzustkowa, elastaza neutrofilii ludzkich, tripsyna, chymotrypsyna)
- (EC 3.4.22.-) – endopeptydazy cysteinowe – zawierają reaktywną cysteinę w centrum aktywnym (np. katepsyny B, H i L)
- (EC 3.4.23.-) – endopeptydazy aspartyłowe – hydrolizują wiązania peptydowe z wykorzystaniem dwóch reszt asparaginianu w centrum aktywnym (np. pepsyny A i B, chymozyna, katepsyny D i E, renina)
- (EC 3.4.24.-) – metaloendopeptydazy – zawierają metal (najczęściej cynk) w centrum aktywnym (np. stromielizyna 1 i 2, żelatynaza A i B, matrylizyna, kolagenaza neutrofilowa, termolizyna)
- (EC 3.4.25.-) – endopeptydazy treoninowe – zawierają N-końcowe aktywne reszty treoniny (jedynym przedstawicielem jest kompleks endopeptydaz proteasomów)
- (EC 3.4.99.-) – endopeptydazy o nieznanym mechanizmie katalizy.

Endopeptydazy serynowe stanowią największą, najszerzej rozpowszechnioną, a zarazem najlepiej poznaną grupę enzymów proteolitycznych. Spełniają one kluczową

rolę w rozlicznych procesach fizjologicznych, takich jak trawienie, krzepnięcie krwi i upłynnianie skrzepów, aktywacja kaskady dopełniacza oraz uwalnianie biologicznie aktywnych peptydów. W wyniku ponad sześćdziesięcioletnich badań poznano szczegółowo strukturę III-rzędową tych białek aż do poziomu przestrzennego ułożenia poszczególnych atomów. Na podstawie badań strukturalnych i kinetycznych poznano dokładnie mechanizm działania tych enzymów. Cechują się one wyjątkowo reaktywną resztą seryny w centrum aktywnym, która stanowi część tzw. łańcucha przeniesienia ładunku złożonego z reszt kwasu asparaginowego (Asp), histydyny (His) i seryny (Ser), połączonych między sobą wiązaniami wodorowymi.

Mechanizm aktywacji endopeptydaz serynowych zostanie omówiony na przykładzie dwóch podstawowych enzymów trawiennych, trypsyny i chymotrypsyny. Są one wytwarzane w trzustce jako nieaktywne prekursorzy (zymogeny): trypsynogen i chymotrypsynogen. Trypsynogen przekształca się w aktywny enzym w wyniku autokatalizy lub działania enteropeptydazy – enzymu proteolitycznego ze śluzówki jelit. Podczas autokatalizy są trawione dwa wiązania peptydowe (Lys6-Ile7 i Lys131-Ser132) i powstaje tzw. alfa-trypsyna, zawierająca dwa łańcuchy stabilizowane mostkami disiarczkowymi. Badania kinetyczne wykazały jednak, że trypsynogen jest o wiele lepszym substratem dla enteropeptydazy niż dla trypsyny (k_{cat}/K_m jest około 12 000 większe dla enteropeptydazy) tak, że *in vivo* przy aktywacji trypsynogenu nie występuje trawienie wiązania Lys131-Ser132, tylko następuje odszczepienie sześciopetydu Val-(Asp)₄-Lys po trawieniu wiązania peptydowego Lys6-Ile7. Powstały produkt (beta-trypsyna) jest jednołańcuchowym polipeptydem stabilizowanym sześcioma mostkami disiarczkowymi. W skład centrum aktywnego tego enzymu wchodzi Ser183, His46, Trp199 i Asp177, według numeracji reszt aminokwasowych dla trypsynogenu. W przypadku chymotrypsynogenu aktywacja trypsyną prowadzi do powstania dwóch dipeptydów (Ser14-Arg15 i Thr147-Asn148) wskutek strawienia czterech wiązań peptydowych. Powstająca alfa-chymotrypsyna zawiera trzy łańcuchy peptydowe połączone dwoma spośród pięciu mostków disiarczkowych cząsteczki.

Niektóre endopeptydazy serynowe jak np. elastaza neutrofilii, występują w komórkach w formie w pełni aktywnej, ale są oddzielone od naturalnych substratów przedziałami błonowymi i mogą manifestować swoją aktywność tylko w określonych warunkach np. w procesie fagocytozy lub po śmierci komórki. Endopeptydazy serynowe są niezbędne w ogromnej większości procesów fizjologicznych lecz mogą również stanowić potencjalne zagrożenie jeżeli ich aktywność nie jest dokładnie kontrolowana w organizmie. Dlatego też aż 10% wszystkich białek osocza krwi stanowią inhibitory enzymów proteolitycznych. Inhibitory peptydaz są obecne także w wydzielinach tkankowych oraz w cytozolu i ziarnistościach niektórych komórek. Zaburzenia w kontrolowaniu aktywności endopeptydaz serynowych są przyczyną takich schorzeń jak: rozedma płuc, zapalenie trzustki, obrzęk naczynioruchowy czy niektóre choroby związane z układem krzepnięcia krwi.

ZAGADNIENIA DO OPRACOWANIA:

- Peptydazy: klasyfikacja i nomenklatura, występowanie, funkcje biologiczne, mechanizm działania (na przykładzie trypsyny), regulacja aktywności, proenzymy/zymogeny, oznaczanie aktywności na substratach białkowych i syntetycznych.
- Wpływ pH i temperatury na aktywność enzymów, mechanizmy tych zjawisk.

- Zasady wszystkich wykonywanych ćwiczeń.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA:

- *Elementy enzymologii*. Witwicki J., Ardelit W. (red.), PWN, Warszawa 1984.

3.3.2. Oznaczanie aktywności trypsyny na substratach białkowych

ZASADA:

Trypsyna (EC 3.4.21.4), tak jak i inne endopeptydazy, działa na substraty wielkocząsteczkowe (np. kazeina, zdenaturowany kolagen) z wytworzeniem produktów na ogół rozpuszczalnych w kwasie trichlorooctowym (TCA). Zawartość tych produktów w supernatancie po odwirowaniu strąconego niestrawionego białka można badać np. spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji charakterystycznej dla aminokwasów aromatycznych (280 nm) lub przy charakterystycznej długości fali dla substratów znakowanych barwnikami związanymi kowalencyjnie (np. azocoll) czy też metodą Lowry'ego (oznacza się przyrost stężenia rozpuszczalnej w kwasie tyrozyny lub peptydów zawierających tyrozynę).

WYKONANIE:

Rozcieńczyć trypsynę 10 razy przy pomocy 0,001 M HCl tzn. odpipetować do oznaczonej probówki wirówkowej typu Eppendorf 100 µl wyjściowego roztworu trypsyny i dodać 900 µl 0,001 M HCl. **UWAGA:** roztwory enzymu przechowywać w lodzie!

Do 6 probówek wirówkowych odpipetować odpowiednio:

- do probówek 1 i 4 po 50 µl roboczego roztworu enzymu i 50 µl wody destylowanej,
- do probówek 2 i 5 po 100 µl roboczego roztworu enzymu,
- do probówek 3 i 6 po 100 µl 0,001 M HCl,

a następnie do probówek 1, 2 i 3 dodać po 1,4 ml zawiesiny substratu azocoll (wstrząsnąć przed pipetowaniem!), a do probówek 4, 5 i 6 po 1,0 ml roztworu kazeiny i prowadzić inkubację przez 15 min w temperaturze 37°C. Po tym czasie probówki ochłodzić w lodzie i do probówek 4–6 dodać po 0,4 ml 20% TCA, wytrząsnąć i pozostawić w lodzie przez 5 min, a następnie wszystkie probówki odwirować przez 2 minuty w mikrowirówce (16 000 obr./min) i w supernatancie z probówek 1–3 dokonać pomiaru absorbancji przy 520 nm na spektrofotometrze (kuweta szklana lub plastikowa), a w supernatancie z probówek 4–6 dokonać pomiaru absorbancji przy 280 nm na spektrofotometrze (kuweta kwarcowa) względem wody destylowanej.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Określić bezwzględne przyrosty absorbancji przez odjęcie wartości próbek ślepych tzn. niezawierających enzymu (3 dla 1 i 2 oraz 6 dla 4 i 5). Aktywność enzymu wyrazić w jednostkach aktywności przyjmując za jednostkę przyrost absorbancji o 0,1 w warunkach doświadczenia. Porównać uzyskane wyniki i przedyskutować przydatność i czułość obu metod oznaczania aktywności proteolitycznej trypsyny.

ODCZYNNIKI:

Trypsyna z trzustki wołowej 2 × krystalizowana 2,4 mg w 10 ml 0,001 M HCl (10 nmoli/ml) — przechowywana w lodzie; azocoll — denaturowany kolagen znakowany

barwnikiem karminowym, 0,25% (w/o) zawiesina w 0,2 M Tris-HCl pH 8,0; kazeina mleka – 2% (w/o) roztwór w 0,2 M buforze Tris-HCl pH 8,0; 20% (w/o) TCA (kwas trichlorooctowy) w wodzie destylowanej (**UWAGA:** odczynnik silnie żrący!); 0,2 M bufor Tris-HCl pH 8,0.

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Pipety automatyczne 2–20 μ l, 20–200 μ l i 200–1000 μ l; termostatowana łaźnia wodna lub termobloki na próbówki typu Eppendorf; spektrofotometr na światło widzialne i ultrafioletowe; kuwety kwarcowe oraz do światła widzialnego; wirówka do próbek typu Eppendorf.

3.3.3. Oznaczanie aktywności trypsyny na substracie syntetycznym i wpływ pH na aktywność enzymatyczną

ZASADA:

Trypsyna (EC 3.4.21.4) hydrolizuje nie tylko wiązania peptydowe w białkowych substratach naturalnych, ale i wiązania estrowe czy amidowe w substratach syntetycznych będących pochodnymi takich aminokwasów jak arginina czy lizyna.

Jeżeli substratem jest np. *p*-nitroanilid benzoilo-L-argininy (BAPNA) to po reakcji hydrolizy uwalnia się wolna *p*-nitroanilina, która absorbuje światło przy 405 nm. Tak więc przez pomiar absorbancji przy długości fali 405 nm można dokonać pomiarów aktywności enzymatycznej trypsyny przy użyciu tego substratu syntetycznego.

WYKONANIE A (metoda tradycyjna z użyciem próbek i spektrofotometru):

a) Rozcieńczyć trypsynę 10 razy przy pomocy 0,001 M HCl. Do 2 próbek wirówkowych odpipetować po 100 μ l roztworu enzymu a do trzeciej 100 μ l 0,001 M HCl. Do wszystkich próbek dodać po 1 ml 0,2 M buforu Tris-HCl o pH 8,0 i po 20 μ l roztworu substratu BAPNA. Wymieszać, inkubować 15 min w temperaturze 37°C a następnie przerwać reakcję enzymatyczną przez dodanie 100 μ l stężonego kwasu octowego i zmierzyć absorbancję względem wody destylowanej przy 405 nm.

b) Do siedmiu próbek wirówkowych odpipetować po 100 μ l 10 razy rozcieńczonej trypsyny, a do ósmej 100 μ l 0,001 M HCl. Kolejno do próbek dodać po 1 ml buforów o pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a do ostatniej 1 ml buforu o pH 7,0. Następnie do każdej próbki dodać po 20 μ l substratu BAPNA i inkubować w temperaturze 37°C przez 15 min, a następnie do każdej próbki dodać 100 μ l kwasu octowego i dokonać pomiaru absorbancji przy 405 nm względem wody destylowanej.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Dla części a) ocenić przydatność oraz powtarzalność metody oznaczania trypsyny z użyciem substratu syntetycznego. Dla części b) wykreślić wykres zależności aktywności właściwej od pH roztworu i wyznaczyć optimum działania trypsyny dla BAPNA jako substratu, przyjmując jako jednostkę aktywności przyrost absorbancji o 0,1 w warunkach doświadczenia. Przedyskutować wynik w kontekście fizjologicznej roli trypsyny w układzie pokarmowym. Aktywność właściwa to liczba jednostek aktywności przypadająca na 1 mg enzymu.

WYKONANIE B (metoda z użyciem mikro płytek i czytnika):

Przygotować polistyrenową płaskodenną mikro płytkę 96-dołkową. Studzienki 1–3 będą przeznaczone do oceny przydatności i powtarzalności oznaczania aktywności trypsyny z substratem syntetycznym, zaś studzienki 4–10 będą przeznaczone do określania wpływu pH na aktywność trypsyny.

Rozcieńczyć trypsynę 5 razy 0,001 M HCl. Do studzienek 1, 2 oraz 4–10 odpipetować po 20 µl roztworu enzymu, a do studzienki trzeciej 20 µl 0,001 M HCl. Następnie do studzienek 1, 2 i 3 odmierzyć po 150 µl 0,2 M buforu Tris-HCl pH 8,0, a do studzienek 4–10 po 150 µl buforów o kolejnych pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Następnie do każdej studzienki oddzielną końcówką dodać po 10 µl substratu BAPNA, mieszając zawartość studzienki poprzez pipetowanie. Płytkę inkubować 15 min w temperaturze 37°C a następnie przerwać reakcję enzymatyczną przez dodanie do każdej studzienki 30 µl stężonego kwasu octowego (mieszając zawartość studzienki końcówką poprzez pipetowanie), po czym zmierzyć absorbancję przy 405 nm na czytniku mikro płytek względem 200 µl wody destylowanej umieszczonej w studzience 11.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Na podstawie wyników pomiarów w studzienkach 1, 2 i 3 ocenić przydatność oraz powtarzalność metody oznaczania trypsyny z użyciem substratu syntetycznego. Dla wyników pomiarów w studzienkach 4–10 wykreślić wykres zależności aktywności właściwej od pH roztworu, wyznaczyć optimum działania trypsyny dla BAPNA jako substratu przyjmując jako jednostkę aktywności przyrost absorbancji o 0,1 w warunkach doświadczenia, a następnie przedyskutować wynik w kontekście roli fizjologicznej trypsyny w układzie pokarmowym. Aktywność właściwa to liczba jednostek aktywności przypadająca na 1 mg enzymu.

ODCZYNNIKI:

Trypsyna z trzustki wołowej 2 × krystalizowana 2,4 mg w 10 ml 0,001 M HCl (10 nmoli/ml) — przechowywana w lodzie; 25 mM roztwór *p*-nitroanilidu benzoilo-L-argininy (BAPNA) w dimetylosulfotlenku (DMSO) (11 mg/ml); stężony kwas octowy do przerywania reakcji enzymatycznej; 0,2 M bufor Tris-HCl pH 8,0; bufony Brittona-Robinsona pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Pipety automatyczne 2–20 µl, 20–200 µl i 200–1000 µl; termostatowana łaźnia wodna, termoblok na probówki Eppendorfa albo termoblok na mikro płytki 96-dołkowe; spektrofotometr na światło widzialne lub czytnik mikro płytek 96-dołkowych; płaskodenne polistyrenowe mikro płytki 96-dołkowe; kuwety do światła widzialnego.

3.3.4. Wpływ temperatury na aktywność trypsyny

WYKONANIE:

Rozcieńczyć trypsynę 10 razy 0,001 M HCl. Do 5 probówek wirówkowych odpipetować po 50 µl roztworu enzymu, 1 ml 0,2 M buforu Tris-HCl pH 8,0 i po 20 µl roztworu substratu BAPNA. Wymieszać i inkubować w temperaturach 0, 25, 37, 47 i 57°C przez 30 min. Przerwać reakcję enzymatyczną przez dodanie 100 µl stężonego kwasu octowego i zmierzyć absorbancję przy 405 nm względem wody destylowanej.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Wykreślić zależność aktywności właściwej trypsyny od temperatury inkubacji mieszaniny reakcyjnej. Przedyskutować wyniki.

ODCZYNNIKI:

Trypsyna z trzustki wołowej 2 × krystalizowana 2,4 mg w 10 ml 0,001 M HCl (10 nmoli/ml) – przechowywana w lodzie; 0,2 M bufor Tris-HCl pH 8,0; 25 mM roztwór *p*-nitroanilidu benzoilo-L-argininy (BAPNA) w dimetylosulfotlenku (DMSO) (11 mg/ml).

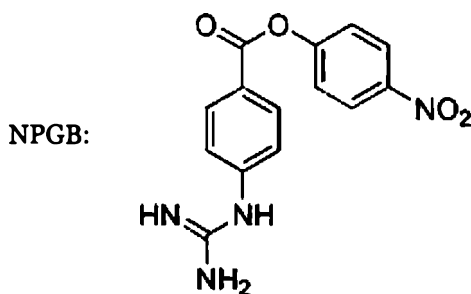
MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Pipety automatyczne 2–20 μ l, 20–200 μ l i 200–1000 μ l; termostатовana łaźnia wodna lub termobloki na próbówki typu Eppendorf; spektrofotometr na światło widzialne.

3.3.5. Miareczkowanie centrum aktywnego trypsyny przy użyciu *p*-nitrofenylo-*p*'-guanidynobenzoesu

ZASADA:

p-Nitrofenylo-*p*'-guanidynobenzoesan (NPGB) jest w enzymologii najpowszechniej stosowanym odczynnikiem do miareczkowania centrum aktywnego peptydaz serynowych, czyli innymi słowy do precyzyjnego określania stężenia aktywnych enzymów. Charakterystyczną cechą NPGB jako pseudosubstratu peptydaz serynowych jest bowiem to, że bardzo szybko tworzy on z proteinazą kompleks enzymatyczny ES i odszczepia pierwszy z produktów – barwny *p*-nitrofenol. Natomiast przejściowo acylowany enzym ES' ma bliską zeru stałą prędkości dysocjacji k_3 , długo pozostając w stanie zablokowanym i pozwalając na precyzyjny spektrofotometryczny pomiar uwolnionego w pierwszym etapie reakcji *p*-nitrofenolu. Znając molowy współczynnik absorpcji *p*-nitrofenolu dla 402 nm ($18\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) można wyliczyć ilość aktywnego enzymu.



WYKONANIE:

a) Pomiar rzeczywistej ilości białka w roztworze enzymu:

Korzystając z następujących danych: masa cząsteczkowa trypsyny $M_r = 24\ 000$; współczynnik absorpcji 1% roztworu trypsyny mierzony przy 280 nm w kuwecie kwarcowej 1 cm ($A_{1\%, 1\text{cm}} = 14,4$ oraz dokonując pomiaru absorpcji badanego

roztworu trypsyny (rozcieńczonego 5 razy 0,001 M HCl) przy 280 nm na spektrofotometrze względem 0,001 M HCl wyliczyć rzeczywiste stężenie trypsyny w roztworze.

b) Miareczkowanie centrum aktywnego enzymu:

Do kuwety spektrofotometru dodać 0,8 ml buforu i 0,2 ml 0,001 M HCl i dokonać zerowania spektrofotometru dla długości fali 405 nm. O czasie o dodać do kuwety 10 μ l roztworu substratu równocześnie włączając stoper. Co 30 sekund (przez 3 minuty) dokonywać pomiarów absorbancji przy 405 nm. W analogiczny sposób dokonać pomiaru przy użyciu roztworu enzymu (nierozcieńczonego) zamiast HCl.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Przygotować wykres zależności zmian absorbancji względem czasu i z różnicy ekstrapolowanych wartości uzyskanych dla czasu o obliczyć (korzystając z molowego współczynnika absorbancji p -nitrofenolu $18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) jego ilość uwolnioną w reakcji. Ilość ta odpowiada ilości aktywnego enzymu użytego do miareczkowania. Wyliczyć procent aktywnego enzymu w preparacie handlowym.

ODCZYNNIKI:

Roztwór trypsyny 5 mg w 2 ml 0,001 M HCl przechowywany w lodzie; roztwór substratu: 0,02 M p -nitrofenylo- p' -guanidynobenzoesan, 7 mg substratu w 1 ml N,N'-dimetyloformamidu; 0,2 M bufor Tris-HCl pH 8,0.

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Pipety automatyczne 2–20 μ l, 20–200 μ l i 200–1000 μ l; spektrofotometr UV/VIS; kuwety kwarcowe, kuwety do światła widzialnego.

3.3.6. Hamowanie aktywności trypsyny przez inhibitor z nasion soi

ZASADA:

Inhibitor trypsyny z nasion soi łączy się z enzymem w stosunku molowym 1:1. Przez inkubację stałej znanej ilości enzymu ze wzrastającą ilością inhibitora i oznaczenie resztkowej ilości enzymu przy użyciu syntetycznego substratu można otrzymać tzw. krzywą miareczkowania enzymu inhibitorem, a z niej wyznaczyć stosunek molowy wiązania lub też wyliczyć rzeczywiste stężenie inhibitora (procent aktywnego inhibitora w preparacie handlowym).

WYKONANIE A (metoda tradycyjna z użyciem probówek i kolorymetru):

Do 6 oznakowanych probówek Eppendorf (1,5 ml) odpipetować po 100 μ l roztworu trypsyny (0,1 nmola), a do siódmej (próbka ślepa) 100 μ l 0,001 M HCl. Następnie dodać do kolejnych probówek odpowiednio po 1000, 980, 960, 940, 920, 900 i 1000 μ l 0,2 M buforu Tris-HCl pH 8,0 i do pierwszych sześciu probówek po 0, 20, 40, 60, 80 i 100 μ l 50 razy rozcieńczonego buforem roztworu sojowego inhibitora trypsyny. Probówki zamknąć, zawartość wymieszać, preinkubować 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie do każdej próbki dodać po 20 μ l substratu BAPNA, wymieszać i inkubować 15 min w temperaturze 37°C. Reakcję przerwać przez dodanie do każdej probówki po 100 μ l kwasu octowego, po czym zmierzyć absorbancję przy 405 nm względem próby ślepej.

WYKONANIE B (metoda z użyciem mikroplętek i czytnika):

Przygotować polistyrenową płaskodenną mikroplętkę 96-dołkową. Do 6 kolejnych studzienek odpipetować po 20 μl roztworu trypsyny, a do siódmej (próba ślepa) 20 μl 0,001 M HCl. Następnie dodać do nich odpowiednio po 100, 98, 95, 90, 85, 80 i 100 μl 0,2 M buforu Tris-HCl pH 8,0 i do pierwszych sześciu studzienek po 0, 2, 5, 10, 15 i 20 μl 50 razy rozcieńczonego buforem roztworu sojowego inhibitora trypsyny. Po każdym odpipetowaniu inhibitora wymieszać zawartość studzienki poprzez pipetowanie po czym zmienić końcówkę na nową. Płytkę preinkubować 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie do każdej dodać po 10 μl substratu BAPNA mieszając zawartość studzienki poprzez pipetowanie po czym inkubować płytke 15 min w temperaturze 37°C. Reakcję przerwać przez dodanie do każdej studzienki po 30 μl kwasu octowego, po czym zmierzyć absorbancję na czytniku mikroplętek przy 405 nm względem próby ślepej (siódma studzienka).

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Wykreślić wykres zależności resztkowej aktywności enzymatycznej od ilości dodanego inhibitora. Przez ekstrapolację krzywej wyznaczyć graficznie stężenie inhibitora, po czym obliczyć rzeczywiste, końcowe stężenie aktywnego inhibitora w preparacie wyjściowym. Masa cząsteczkowa sojowego inhibitora trypsyny wynosi 21 kDa zaś trypsyny 23 kDa.

ODCZYNNIKI:

Sojowy inhibitor trypsyny (STI) roztwór 2,1 mg/ml buforu 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0; trypsyna z trzustki wołowej 2 \times krystalizowana 2,4 mg w 10 ml 0,001 M HCl (10 nmoli/ml) przechowywana w lodzie; 0,2 M bufor Tris-HCl pH 8,0; 25 mM roztwór *p*-nitroanilidu benzoilo-L-argininy (BAPNA) w dimetylosulfotlenku (DMSO) (11 mg/ml).

MATERIAŁY I SPRZĘT LABORATORYJNY:

Pipety automatyczne 2–20 μl , 20–200 μl i 200–1000 μl ; termostatowana łaźnia wodna, termoblok na probówki Eppendorfa albo termoblok na mikroplętki 96-dołkowe; spektrofotometr na światło widzialne lub czytnik mikroplętek 96-dołkowych; płaskodenne polistyrenowe mikroplętki 96-dołkowe; kuwety do pomiaru w świetle widzialnym.