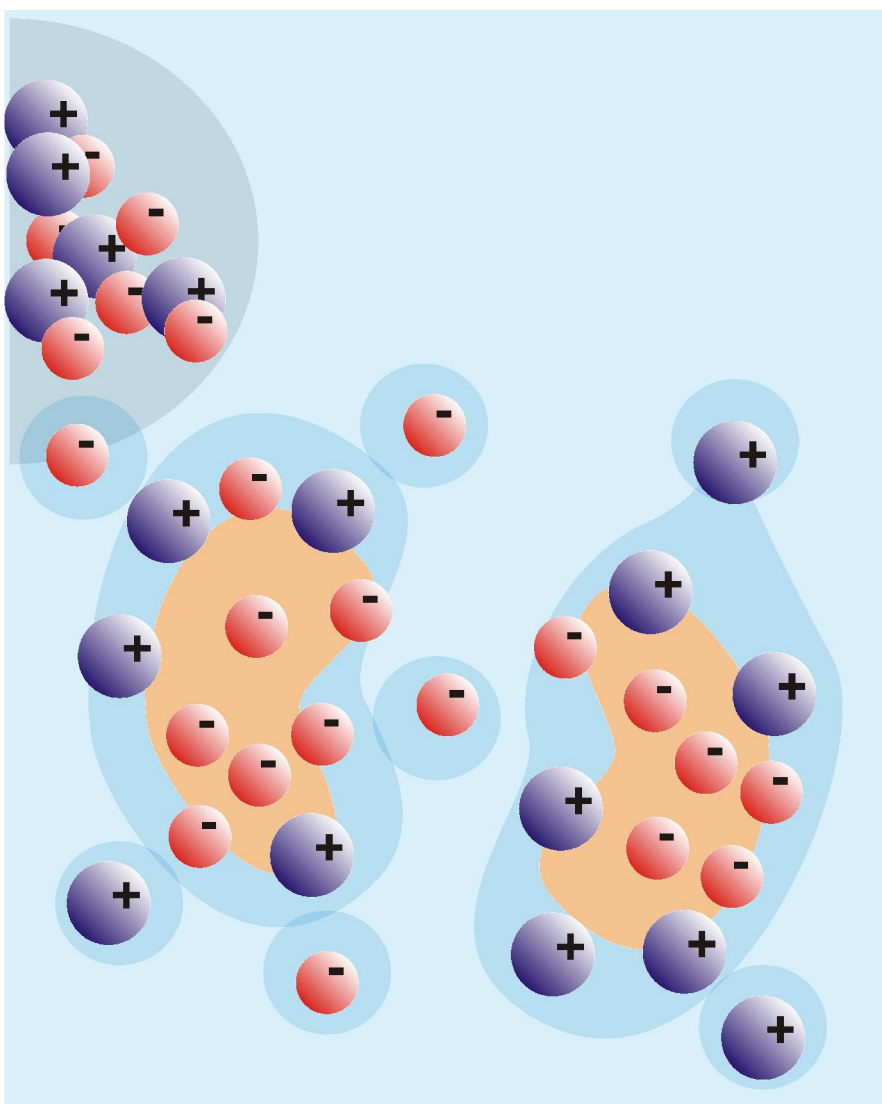




PTF

Praktikum iz biokemije



Ivica Strelec
Tihomir Kovač

Osijek, 2013.

Izdavač: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Urednici: Ivica Strelec
Tihomir Kovač

Recenzent: Drago Bešlo

Osijek, 2013.

Sadržaj

Metode određivanja koncentracije proteina	1
Vježba 1. Određivanje koncentracije proteina UV-metodom.....	4
Vježba 2. Određivanje koncentracije proteina Lowryjevom metodom.....	6
Vježba 3. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom.....	9
Metode određivanja aktivnosti enzima.....	12
Vježba 4. Određivanje aktivnosti katalaze kontinuiranim spektrofotometrijskim testom	13
Vježba 5. Određivanje aktivnosti pepsina testom fiksnog vremena.....	19
Vježba 6. Određivanje aktivnosti ureaze testom fiksnog vremena.....	23
Pretraživanje proteinskih i enzimskih baza podataka.....	26
Vježba 7. Pretraživanje enzimske baze podataka BRENDA.....	29
Enzimska kinetika	30
Vježba 8. Vremenski tijek reakcije	34
Vježba 9. Utjecaj pH na brzinu enzimske reakcije.....	38
Vježba 10. Utjecaj koncentracije supstrata na brzinu enzimske reakcije	41
Organizacija eukariotske DNA u više stukture	45
Vježba 11. Izolacija DNA iz kivija	46
Uvod u metabolizam – probava hrane	49
Vježba 12. Simulacija probave proteina u želucu.....	51

Metode određivanja koncentracije proteina

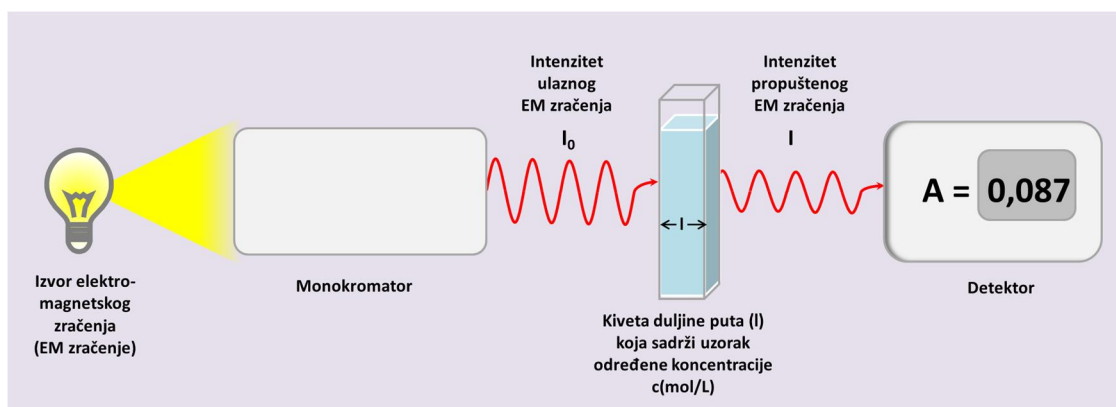
Određivanje koncentracije proteina jedan je od uvriježenih postupaka, odnosno koraka u biokemijskim analizama različitih vodenih ili puferskih ekstrakata organa, tkiva ili stanica. Pri tome nam na raspolaganju stoji čitav niz metoda, no najčešće korištene su Lowryjeva i Bradfordičina metoda. Uz navedene svakako treba istaknuti i UV-metodu (*UV, eng. Ultra Violet; hrv. ultraljubičasti dio spektra*) koja se prije svega koristi za određivanje koncentracije proteina u otopinama čistih proteina.

Sve ove metode spadaju u skupinu takozvanih indirektnih metoda određivanja koncentracije proteina, što podrazumijeva mjerenje apsorbancije otopine proteina pomoću spektrofotometra, i potom preračunavanje vrijednosti izmjerene apsorbancije u količinu proteina pomoću baždarnog dijagrama.

Postavlja se pitanje što je to apsorbancija? Apsorbancija (A) predstavlja logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja (I_0) i propuštenog zračenja (I) kroz uzorak, odnosno otopinu proteina:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

O čemu se zapravo radi? Izložimo li otopinu proteina ili bilo kojih drugih molekula elektromagnetskom zračenju točno određene valne duljine, tada molekule u otopini apsorbiraju dio tog zračenja, a dio zračenja prolazi kroz kivetu sa otopinom molekula te biva detektiran (izmjeran) na detektoru (**Slika 1**). Pri tome ukoliko molekule u otopini apsorbiraju elektromagnetsko zračenje u području svih valnih duljina vidljivog dijela spektra (400-800 nm), uzorak izgleda crn, odnosno ukoliko molekule u otopini ne apsorbiraju EM zračenje u području vidljivog dijela spektra uzorak izgleda proziran.



Slika 1. Princip mjerenja apsorbancije na spektrofotometru

Izvor elektromagnetskog zračenja odašilje EM zračenje širokog spektra koje ulazi u monokromator (prizmu). Monokromator potom propušta EM zračenje samo točno određene valne duljine koje prolazi kroz uzorak u kiveti duljine puta (l). Uzorak apsorbira dio EM zračenja, a količina apsorbiranog zračenja je proporcionalna koncentraciji uzorka. Dio zračenja koji nije apsorbiran prolazi kroz uzorak (propušteno EM zračenje) i mjeri se na detektoru te najčešće izražava kao apsorbancija (A).

Koji je to dio molekule, odnosno atoma u molekuli odgovoran za apsorpciju elektromagnetskog zračenja određene valne duljine? To su elektroni, i to prije svega elektroni dvostrukih veza (π -elektroni) te nespareni elektronski parovi (*prisjetite se da kisik i duših imaju nespareni elektronski par*). Naime, kada se neka molekula u otopini izloži EM zračenju određene valne duljine, tada ovi elektroni u molekuli apsorbiraju dio tog zračenja, te prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje, a neapsorbirani dio EM zračenja prolazi kroz uzorak i biva detektiran na detektoru.

Ovisnost količine apsorbiranog zračenja definirana je Lambert-Beerovim zakonom:

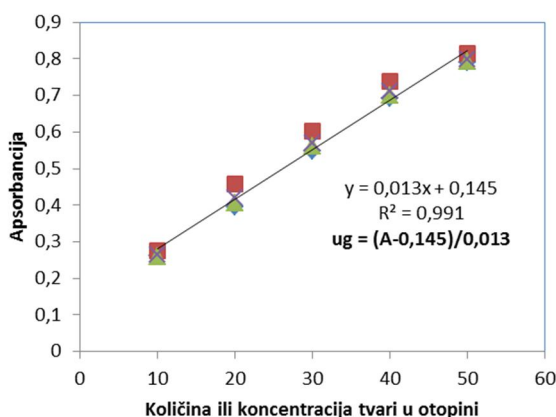
$$\log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \times c \times l$$

gdje je I_0 intenzitet ulaznog EM zračenja, I intenzitet propuštenog EM zračenja, a logaritam njihova omjera predstavlja apsorbanciju (A) koja je ujedno jednaka umnošku molarnog apsorpcijskog koeficijenta, ε (L/mol cm), koncentracije molekula u uzorku, c (mol/L) i duljine puta kroz kivetu, l (cm). Iz navedne formule slijedi da je količina elektromagnetskog zračenja kojeg molekule apsorbiraju ovisna je o debljini sloja otopine kroz koji zračenje prolazi (*tzv. duljina puta kroz kivetu*), te o koncentraciji molekula u otopini, i što su one veće to je i količina apsorbiranog zračenja veća.

Stoga, ukoliko se mjerenje apsorbancije provodi pri konstantnoj duljini puta kroz kivetu (*što je najčešća pojava budući su spektrofotometri i kivete standardizirani; $l = 1$ cm*), tada je izmjerena apsorbancija proporcionalna koncentraciji molekula u otopini. Štoviše, ukoliko nam je poznat molarni apsorpcijski koeficijent (ε) za ispitivanu molekulu, koristeći se gore navedenom formulom možemo na osnovi izmjerene apsorbancije odrediti koncentraciju molekula u uzorku, odnosno ukoliko nam je poznata koncentracija molekula u otopini, tada možemo odrediti molarni apsorpcijski koeficijent ispitivane molekule.

Upravo ćemo u prvoj vježbi koristiti gore navedenu formulu, te na osnovi poznatog molarnog apsorpcijskog koeficijenta i izmjerene apsorbancije odrediti koncentraciju proteina u otopini čistog proteina nepoznate koncentracije.

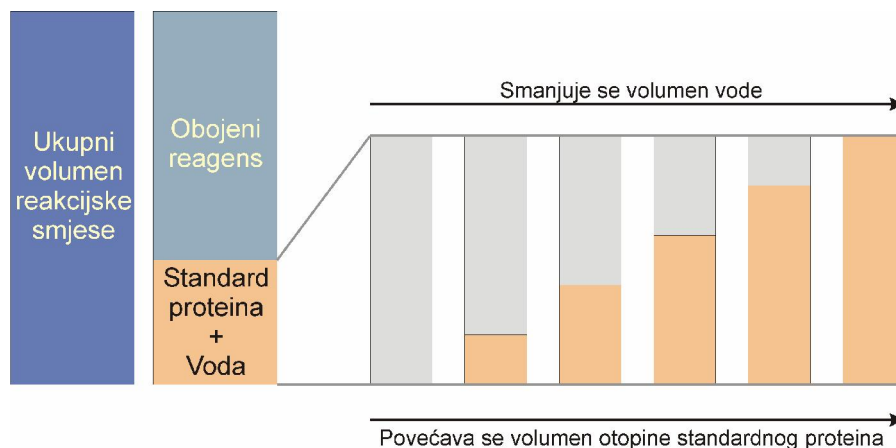
Sljedeće pitanje koje nam se postavlja je što je to baždarni dijagram? Baždarni dijagram je dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije otopine molekula o koncentraciji ili količini molekula u otopini (**Slika 2**). Kada govorimo o proteinima, tada baždarni dijagram predstavlja dijagram ovisnosti intenziteta apsorbancije o količini (koncentraciji) proteina u otopini.



Slika 2. Baždarni dijagram

Ukoliko se koristite računalnim programom (najčešće Excel) dijagram možete linearizirati primjenom opcije „trendline“ (linija trenda) i izraziti najčešće pomoću jednadžbe pravca koja se potom koristi za preračun izmjerene apsorbancije otopine nepoznate koncentracije uzorka u koncentraciju ili količinu tvari prisutne u otopini.

Kako se to priprema baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina? Baždarni dijagram se priprema na takav način da se napravi niz otopina nekog standardnog proteina poznate koncentracije (**Slika 3**), a najčešće korišteni standardni protein je goveđi serumski albumin (*BSA*, eng. *Bovine Serum Albumin*). Potom se u pripremljene otopine dodaje specifični reagens koji stupa u reakciju s proteinima i dovodi do nastanka obojene reakcije, nakon čega se intenzitet obojenja mjeri pri određenoj valnoj duljini na spektrofotometru (vidljivi dio spektra, VIS). Ukoliko se mjerenje apsorbancije pripremljenih otopina standardnog proteina provodi u UV-području, tada otopinama nije potrebno dodati nikakav reagens, nego se pripremljenim otopinama samo izmjeri apsorbancija. Rezultati mjerenja apsorbancije, bilo u UV ili VIS području se potom najčešće računalno obrađuju, a obradom se dobije baždarni dijagram sličan dijagramu prikazanom na **Slici 2**.



Slika 3. Shematski prikaz sastava reakcijske smjese

Zamijetite da je volumen reakcijske smjese uvijek isti. Volumen otopine proteina (standard proteina + voda) je također uvijek isti, zato što se smanjuje volumen dodane vode za toliko za koliko se više doda volumena otopine proteina standarda.

Tek pošto je baždarni dijagram napravljen, moguće je apsorbanciju otopine nepoznatog uzorka preračunati u količinu proteina. Upravo će se vježbe 2 i 3 temeljiti na pripremi baždarnog dijagrama, te izračunu koncentracije ili količine proteina u nepoznatom uzorku.

Vježba 1. Određivanje koncentracije proteina UV-metodom

Svrha vježbe: Upoznati se sa načinom određivanja koncentracije proteina u otopinama standardnih proteina pomoću UV-metode.

UV-metoda je prije svega namijenjena određivanju koncentracije proteina u otopinama čistih proteina ili standardnim otopinama proteina pripremljenim otapanjem određene količine čistog proteina (proteina standarda) u vodi ili puferu. Određivanje koncentracije proteina ovom metodom provodi se mjerenjem apsorbancije otopine proteina pri 280 nm, i potom preračunom vrijednosti apsorbancije u količinu proteina pomoću formule Lambert-Beerovog zakona uz poznati molarni apsorpcijski koeficijent čistog proteina (ϵ):

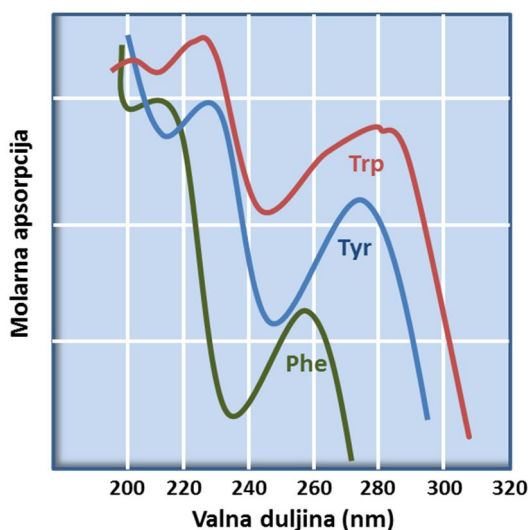
$$\log \frac{I_0}{I} = A = \epsilon \times c \times l$$

Alternativno, koncentraciju proteina u otopini moguće je provesti mjerenjem apsorbancije pri dvije valne duljine, 260 i 280 nm, i potom izračunati pomoću opće formule za izračun masene koncentracije proteina:

$$\gamma(\text{proteina})(\text{mg/mL}) = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$$

gdje se apsorbancija izmjerena pri 280 nm umanjuje za određeni iznos apsorbancije izmjerene pri 260 nm. Pri tome apsorbancija otopine pri 280 nm odražava koncentraciju proteina u otopini, a apsorbancija pri 260 nm prisustvo određene količine nukleinskih kiselina.

Postavlja se pitanje, koji su to elektroni u molekuli proteina odgovorni za apsorpciju EM zračenja pri 280 nm? To su π -elektroni dvostrukih veza u bočnim ograncima aromatskih aminokiselina tirozina (Tyr), triptofana (Trp) i fenilalanina (Phe). Stoga, možemo reći da se mjerenje apsorbancije otopine proteina pri 280 nm temelji na sposobnosti bočnih ogranka aromatskih aminokiselina Tyr, Trp i Phe u proteinu da maksimalno apsorbiraju UV zračenje pri valnim duljinama oko 280 nm (**Slika 4**).



Slika 4. Apsorpcijski maksimum aromatskih aminokiselina

Zadatak vježbe: Odrediti koncentraciju proteina u nepoznatom uzorku UV-metodom mjerenjem apsorpcije pri 280 nm.

Reagensi

Otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) nepoznate koncentracije (Uzorak X); $\epsilon_{1cm}^{0,1\%} = 0,66$

Pribor

UV/VIS spektrofotometar

UV-kivete

Stalak za UV-kivete

Postupak

Sadržaj plastične epruvetice sa uzorkom X preli u UV-kivetu, te izmjeriti apsorpciju pri 280 nm. Nakon mjerenja, uzorak preli iz kivete nazad u plastičnu epruveticu, te čuvati za sljedeću vježbu.

Vrijednost apsorpcije preračunati u koncentraciju proteina koristeći se izvodom formule Lambert-Beerovog zakona:

$$\gamma(\text{proteina})(\text{mg/mL}) = \frac{A}{l \times \epsilon_{1cm}^{0,1\%}}$$

REZULTATI MJERENJA

Uzorak	A ₂₈₀

Izračun koncentracije proteina u nepoznatom uzorku

--

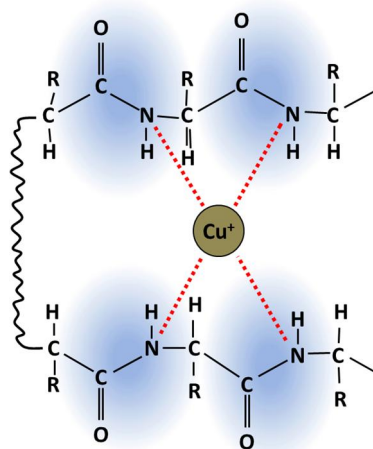
Zaključak	
------------------	--

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Vježba 2. Određivanje koncentracije proteina Lowryjevom metodom

Svrha vježbe: Upoznati se sa pripravom i uporabom baždarnog dijagrama prilikom određivanja koncentracije proteina Lowryjevom metodom.

Lowryjeva metoda određivanja koncentracije proteina se temelji na reakciji bakrenih iona koordinativno vezanih za amino skupine peptidnih veza u proteinu i fenolne skupine bočnog ogranka aminokiseline Tyr u proteinu sa Folin-Ciocalteu reagensom, pri čemu nastaje kompleks plavo-ljubičastog obojenja sa maksimumom apsorbancije pri 660 nm (**Slika 5**).



Slika 5. Princip određivanja koncentracije proteina Lowry metodom

Bakreni ioni koordinativno vezani na amino skupine peptidne veze i fenolna skupina tirozina (Tyr) reduciraju fosfovolfram i fosfomolibden kiselinu Folinovog reagensa u volfram i molibden plavilo.

Folin-Ciocalteu (Folinov) reagens sadrži fosfovolfram i fosfomolibden kiselinu koje bakreni ioni koordinirano vezani na amino skupine peptidne veze i fenolna skupina tirozina (Tyr) reduciraju u volfram i molibden plavilo.

Zadatak vježbe: Iz otopine standardnog proteina (BSA) pripremiti baždarni dijagram te na osnovi baždarnog dijagrama odrediti koncentraciju proteina u nepoznatom uzorku.

Reagensi

Otopina goveđeg serumskog albumina, γ (BSA) = 1 mg/mL

Alkalna otopina I (2% Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH)

Alkalna otopina II (0,5% CuSO_4 u 1% K – Na – tartaratu)

Folin – Ciocalteu reagens (komercijalni reagens razrijeđen s vodom u omjeru 1:1)

Pribor

UV/VIS spektrofotometar

Vodena kupelj

Vortex mješalica

Pipetor dispensor (5 mL)

Epruvete 10 mL

Stalak za epruvete

Mikropipete 10-100; 100-1000 μL

PMMA kivete

Stalak za kivete

Postupak

Iz otopine goveđeg serumskog albumina BSA, $\gamma(\text{BSA}) = 1 \text{ mg/mL}$, u epruvetama pripremiti niz otopina proteina poznate koncentracije (*standardni niz*) volumena 100 μL prema sljedećoj shemi :

Standardni niz	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6
μg proteina	0	10	20	40	60	80	100

Izračun volumena standardne otopine proteina i priprema standardnog niza

Koristeći se formulom za masenu koncentraciju izračunati koliko je μL otopine proteina masene koncentracije $\gamma = 1 \text{ mg/mL}$ potrebno dodati u reakcijsku smjesu određenog uzorka standardnog niza kako bi se postigla željena količina (masa) proteina, i potom izračunati koliko je μL H_2O potrebno dodati kako bi ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 100 μL .

Tablica standardnog niza

μg proteina	V(BSA 1mg/mL) [μL]	V(H_2O) [μL]
0		
10		
20		
40		
60		
80		
100		

Izračun volumena nepoznatog uzorka i priprema

Koristeći se formulom za masenu koncentraciju izračunati koliko je μL nepoznate otopine proteina (*uzorka X*) potrebno dodati u reakcijsku smjesu, kako biste bili u sredini standardnog niza, i potom izračunati koliko je μL H_2O potrebno dodati kako bi ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 100 μL .

Napomena: uzorku X ste odredili masenu koncentraciju u vježbi 1.

Izračun volumena nepoznatog uzorka	
------------------------------------	--

μg proteina	V(uzorka) [μL]	V(H_2O) [μL]

Nakon pripreme standardnog niza kao i nepoznatog uzorka, u epruvete dodati po 1 mL alkalne otopine, smjesu promiješati na vortex miješalici i ostaviti stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta, dodati po 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa, smjesu dobro promiješati na vortex

miješalici te termostatirati u vodenoj kupelji 15 minuta pri 37°C. Po isteku termostatiranja očitati apsorbanciju otopina standardnog niza i otopine proteina nepoznate koncentracije pri valnoj duljini 660 nm, uz „zeroiranje“ instrumenta slijepom probom (S0).

Na osnovi rezultata mjerenja u programu Excel napraviti baždarni dijagram te linearnom regresijom odrediti proračunsku formulu. Proračunsku formulu koristiti za izračun količine proteina.

REZULTATI MJERENJA

Izmjerene vrijednosti apsorbancije

μg proteina	ΔA_{660nm}
0	
10	
20	
40	
60	
80	
100	
Nepoznati uzorak	

Formula iz baždarnog dijagrama

Formula za izračun količine proteina

Izračun količine proteina u nepoznatom uzorku

Uzorak	Volumen uzorka [μL]	ΔA_{660nm}	μg BSA	μg/μL
Nepoznati uzorak				

Zaključak	
------------------	--

Objasnite princip određivanja koncentracije proteina metodom po Lowryju.

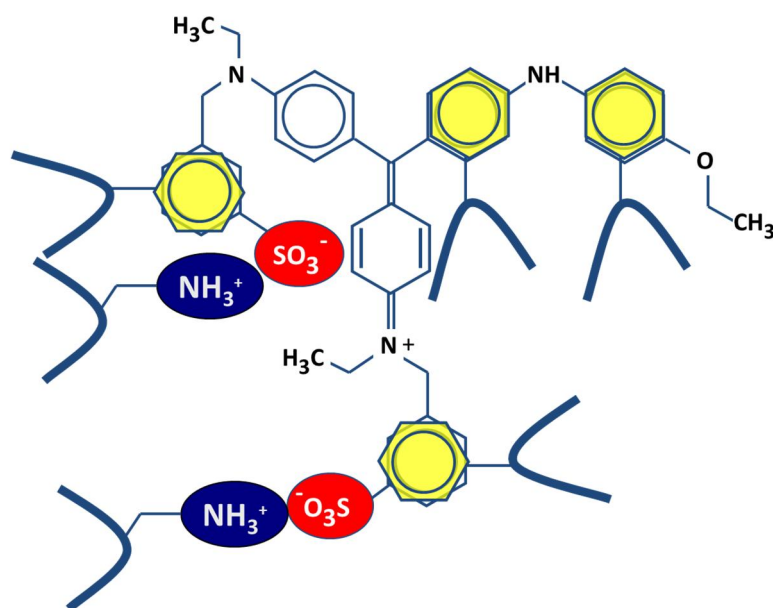
--

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Vježba 3. Određivanje koncentracije proteina Bradfordčinom metodom

Svrha vježbe: Upoznati se sa pripravom i uporabom baždarnog dijagrama prilikom određivanja koncentracije proteina Bradfordčinom metodom.

Bradfordčina metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein:boja, koji u kiseloj mediju pokazuje maksimum apsorpcije pri 595 nm (**Slika 6**).



Slika 6. Princip određivanja koncentracije proteina Bradfordčinom metodom

Zadatak vježbe: Iz otopine standardnog proteina (BSA) pripremiti baždarni dijagram te na osnovi baždarnog dijagrama odrediti koncentraciju proteina u nepoznatom uzorku.

Reagensi

Otopina goveđeg serumskog albumina, γ (BSA) = 1 mg/mL

Bradfordčin reagens

Pribor

UV/VIS spektrofotometar

Vortex mješalica

Pipetor dispensor (5 mL)

Stalak za kivete

Mikropipete 10-100; 100-1000 μ L

PMMA kivete

Postupak

Iz otopine goveđeg serumskog albumina BSA, γ (BSA) = 1 mg/mL, u kivetama pripremiti niz otopina proteina poznate koncentracije (*standardni niz*) volumena 100 μ L prema sljedećoj shemi :

Standardni niz	S0	S1	S2	S3	S4	S5
µg proteina	0	10	20	30	40	50

Izračun volumena standardne otopine proteina i priprema standardnog niza

Koristeći se formulom za masenu koncentraciju izračunati koliko je µL otopine proteina masene koncentracije $\gamma = 1 \text{ mg/mL}$ potrebno dodati u reakcijsku smjesu određenog uzorka standardnog niza kako bi se postigla željena količina (masa) proteina, i potom izračunati koliko je µL H₂O potrebno dodati kako bi ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 100 µL.

Tablica standardnog niza

µg proteina	V(BSA 1mg/mL) [µL]	V(H ₂ O) [µL]
0		
10		
20		
30		
40		
50		

Izračun volumena nepoznatog uzorka i priprema

Koristeći se formulom za masenu koncentraciju izračunati koliko je µL nepoznate otopine proteina (uzorka X) potrebno dodati u reakcijsku smjesu, kako biste bili u sredini standardnog niza, i potom izračunati koliko je µL H₂O potrebno dodati kako bi ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 100 µL.

Napomena: uzorku X ste odredili masenu koncentraciju u vježbi 1.

Izračun volumena nepoznatog uzorka	
------------------------------------	--

µg proteina	V(uzorka) [µL]	V(H ₂ O) [µL]

Nakon pripreme standardnog niza kao i nepoznatog uzorka, u kivete dodati po 2 mL Bradfordičinog reagensa te ostaviti stajati na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Po isteku vremena očitati apsorbanciju otopina standardnog niza i otopine proteina nepoznate koncentracije pri valnoj duljini 595 nm, uz „zeroiranje“ instrumenta slijepom probom (S0).

Na osnovi rezultata mjerenja u programu Excel napraviti baždarni dijagram te linearnom regresijom odrediti proračunsku formulu. Proračunsku formulu koristiti za izračun količine proteina.

REZULTATI MJERENJA

Izmjerene vrijednosti apsorbancije

$\mu\text{g proteina}$	$\Delta A_{595\text{nm}}$
0	
10	
20	
30	
40	
50	
Nepoznati uzorak	

Formula iz baždarnog dijagrama

Formula za izračun količine proteina

Izračun količine proteina u nepoznatom uzorku

Uzorak	Volumen uzorka [μL]	$\Delta A_{595\text{nm}}$	$\mu\text{g BSA}$	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Nepoznati uzorak				

Zaključak

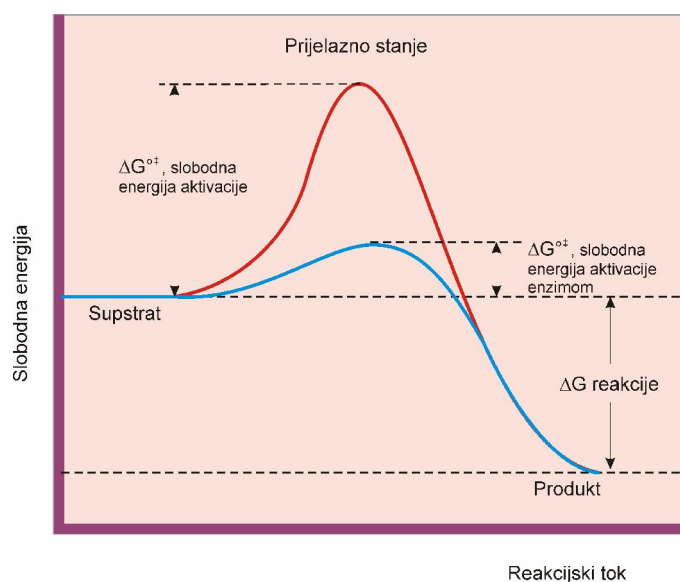
Objasnite princip određivanja koncentracije proteina metodom po Bradfordici.

Pregledano

Potpis nastavnika

Metode određivanja aktivnosti enzima

Enzimi su proteini koji ubrzavaju biokemijske reakcije u organizmu. To čine na takav način da snižavaju Gibbsovu slobodnu energiju aktivacije potrebnu da bi se reaktant (supstrat) preveo u produkt (**Slika 7**), odnosno stupaju u reakciju sa supstratom te tvore kratkoživući enzim-supstrat kompleks koji se potom raspada u enzim i produkt, i na taj način stvaraju novi reakcijski put sa nižom energijom aktivacije.



Slika 7. Reakcijski tok nekatalizirane i katalizirane reakcije

Vrlo često se u analizi prihvatljivosti sirovina za proizvodnju određenih prehrambenih proizvoda ili u kontroli određenih proizvodnih procesa provodi mjerenje aktivnosti specifičnih enzima. Tako na primjer određivanje aktivnosti enzima amilaze indirektno preko broja padanja služi kao pokazatelj amilolitičke aktivnosti ovog enzima u brašnu, a time i prihvatljivosti brašna u proizvodnji kruha. Određivanje aktivnosti katalaze ili peroksidaze služi kao pokazatelj termičkog tretmana proizvoda ili sirovine, određivanje aktivnosti polifenol oksidaze kao indikator prihvatljivosti brašna za proizvodnju tjestenine, a određivanje aktivnosti ureaze kao indikator pravilnog termičkog tretmana soje.

Određivanje aktivnosti enzima podrazumijeva mjerenje promjene količine supstrata ili produkta u određenom vremenskom razdoblju. Pri tome se aktivnost enzima može mjeriti direktno ukoliko su supstrat ili produkt jednostavno mjerljivi, ili indirektno ukoliko se ne mogu direktno izmjeriti. U tom slučaju se količina utrošenog supstrata ili nastalog produkta detektira dodatkom određenog reagensa koji s njima reagira te dovodi do nastanka obojene otopine.

Ukoliko se promjena količine supstrata ili produkta tijekom enzimske reakcije može mjeriti direktno, tada će se za mjerenje aktivnosti enzima najčešće koristiti kontinuirani test. Kontinuirani test podrazumijeva praćenje promjene koncentracije supstrata ili produkta u kratkim vremenskim intervalima tijekom određenog vremena.

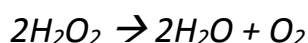
Za razliku od kontinuiranog testa, aktivnost enzima moguće je odrediti i testom fiksnog vremena. Test fiksnog vremena podrazumijeva da enzimsku reakciju pustimo da se odvija neko vrijeme, te je zatim prekinemo bilo inhibicijom bilo denaturacijom enzima, nakon čega odredimo količinu nastalog produkta ili utrošenog supstrata. Ovaj oblik testa se najčešće koristi u slučaju kada promjenu koncentracije supstrata ili produkta nije moguće pratiti direktno.

Upravo se vježbama 4, 5 i 6 učimo načinima određivanja aktivnosti enzima. U vježbi 4 učimo odrediti aktivnost enzima kontinuiranim testom, a u vježbama 5 i 6 testom fiksnog vremena.

Vježba 4. Određivanje aktivnosti katalaze kontinuiranim spektrofotometrijskim testom

Svrha vježbe: Upoznati se sa postupkom izoliranja i ekstrakcije enzima iz biološkog uzorka primjenom ultrazvučnog razbijanja, postupkom određivanja aktivnosti enzima kontinuiranim testom te načinima izražavanja enzimske aktivnosti.

Katalaza (EC 1.11.1.6) je enzim široko rasprostranjen u prokariota i eukariota koji ima značajnu ulogu u antioksidacijskoj obrani organizma. Katalaza provodi enzimsku razgradnju za organizam štetnog vodikova peroksida u vodu i kisik.



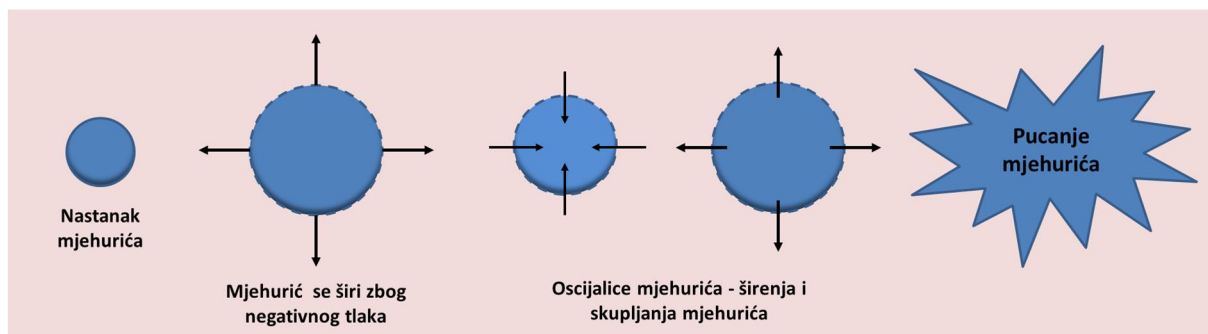
Određivanje aktivnosti ovog enzima se najčešće provodi kontinuiranim UV-spektrofotometrijskim testom. Test se temelji na praćenju sniženja apsorbancije reakcijske smjese pri 240 nm (UV-područje), nastale kao rezultat enzimske razgradnje vodikova peroksida koji pokazuje maksimum apsorbancije pri 240 nm ($\epsilon^{mm}=0,0436$).

Da bismo mogli ispitati aktivnost katalaze, prvo je potrebno izolirati enzim iz pileće jetre. Katalazu ćemo izolirati i ekstrahirati razbijanjem stanica jetre pomoću ultrazvuka, a potom je odvojiti od ostatka razbijenih staničnih struktura centrifugiranjem.

Stoga ćemo ukratko pojasniti ultrazvučnu homogenizaciju i centrifugiranje, da bismo shvatili kako ćemo to ultrazvukom razbiti stanice, te kako ćemo centrifugiranjem odvojiti enzim od ostatka razbijenih staničnih struktura.

Znatno detaljnije o načinima razbijanja stanica, kao i metodama centrifugiranja možete pročitati u popratnim materijalima uz predavanja iz biokemije – Metode izolacije i pročišćavanja proteina, dostupnim na web stranici.

Ultrazvuk je zvučni val frekvencije od 20 kHz do 10 MHz nečujan ljudskom uhu. Kada suspenziju stanica ili komadića tkiva izložimo djelovanju ultrazvučnih valova, širenje utrazvučnih valova kroz suspenziju dovodi do stvaranja izmjeničnih pritisaka i ekspanzijskih vrtloga koji uzrokuju stvaranje negativnog tlaka te nastanak sitnih mjehurića pare. Nastali mjehurići (tzv. *kavitacije*) snažno osciliraju te nakon brojnih ciklusa ekspanzije (*širenja*) i kompresije (*skupljanja*) implodiraju (**Slika 8**), uslijed čega se oslobađa velika sila pritiska koje djeluje na komadiće tkiva ili stanice i uzrokuje razaranje komadića tkiva, pucanje stanica i oslobađanje unutarstaničnog sadržaja.

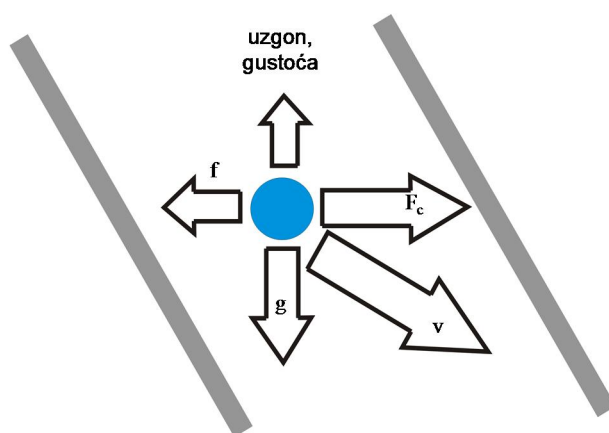


Slika 8. Nastanak kavitacije uslijed djelovanja ultrazvučnih valova

Ekstrahirane proteine (u našem slučaju enzim katalazu) potrebno je odvojiti od razbijenih staničnih struktura i za to odvajanje ćemo koristiti centrifugiranje.

Postavlja se pitanje što je to centrifugiranje? Centrifugiranje je proces razdvajanja tvari na osnovu molekulske mase, oblika, veličine i gustoće čestica primjenom centrifugalnog polja. Laički rečeno, centrifugiranje možemo smatrati taloženjem pod djelovanjem umjetne sile teže.

O čemu se zapravo radi? Ukoliko na česticu određene mase (*razbijene stanične strukture*) primijenimo kružno gibanje, tada na tu česticu djeluje sila koja je pokušava radijalno izbaciti van, centrifugalna sila (F_c). S druge strane, gibanju čestice pod djelovanjem centrifugalne sile opire se okolna tekućina koeficijentom trenja (f), svojom gustoćom i djelovanjem uzgona (**Slika 9**). Osim toga, na česticu djeluje i zemljina sila teža (g). Stoga kretanje čestice u primijenjenom centrifugalnom polju (*taloženje*) predstavlja sveukupni vektorski zbroj sila koje djeluju na tu česticu dajući joj brzinu i smjer kretanja (v).



Slika 9. Sveukupni zbroj sila koje djeluju na česticu u primijenjenom centrifugalnom polju
Ukupan vektorski zbroj sila daje brzinu kretanja (taloženja) čestice v , u primijenjenom centrifugalnom polju

Za odvajanje ekstrahirane katalaze od ostatka razbijenih staničnih struktura služiti ćemo se tzv. diferencijalnim centrifugiranjem. Pri diferencijalnom centrifugiranju uzorak se razdjeljuje u dvije

frakcije: talog (*sediment*) i tzv. supernatant (*frakcija koja nije sedimentirala, bistri tekući dio iznad taloga*), a nakon centrifugiranja se frakcije mogu odijeliti jedna od druge dekantiranjem.

Postavlja se pitanje, kako ćemo biti sigurni da smo odvojili naš enzim od ostataka razbijenih staničnih struktura? Kao prvo, koristiti ćemo poznate uvjete da bismo odvojili naš enzim od tih struktura (**Tablica 1**), a osim toga uvjerit ćemo se vizualno nakon centrifugiranja – supernatant će biti bistar.

Tablica 1. Uvjeti sedimentacije (taloženja) različitih staničnih frakcija

Frakcija koja se sedimentira (taloži)	RCF (x g)*	Vrijeme (min)
Stanice (eukariota)	1000	5
Kloroplasti, stanične membrane, jezgra	4000	10
Mitohondriji, bakterijske stanice	15000	20
Lizozomi, bakterijske membrane	30000	30
Ribosomi	100000	180

* RCF – relativna centrifugalna sila

Zadatak vježbe: Iz pileće jetre izolirati i ekstrahirati katalazu te joj kontinuiranim UV testom odrediti aktivnost. Aktivnost enzima izraziti u $\mu\text{mol/min mL}$, U/mL , $\mu\text{mol/min mg}$ i U/mg .

Uzorak i reagensi

Pileća jetra

50 mM fosfatni pufer pH 7,0 sa 5 mM EDTA

20 mM otopina vodikova peroksida u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,0

50 mM fosfatni pufer pH 7,0

Pribor

Ultrazvučni homogenizator Labsonic M

Mikser sjeckalica

Centrifuga

Plastične epruvetice

UV/VIS spektrofotometar

Mikropipete 10-100; 100-1000 μL

UV kivete

Stalak za kivete

Štoperica

Postupak

Pileću jetru narezati na tanke ploške, a ploške na kockice i potom izvagati 150 mg tako usitnjene jetre u plastične epruvetice za centrifugiranje volumena 2 mL. Zatim dodati 1,5 mL 50 mM fosfatnog pufera pH 7,0 sa 5 mM EDTA i suspenziju blago promiješati na vortex mješalici.

Uzorak potom razbiti ultrazvukom pri punom ciklusu ($C = 1$) i amplitudi ($A = 100\%$) u 4 intervala po 30 sekundi, uz stalno hlađenje uzorka na ledu. Između intervala razbijanja praviti pauzu od 10 sekundi.

Nakon razbijanja ekstrakt izbistriti centrifugiranjem (15000 g, 4°C , 10 min). Bistri ekstrakt odliti i koristiti za određivanje aktivnosti katalaze i proteina.

Za određivanje koncentracije proteina i aktivnosti katalaze bistri ekstrakt je potrebno razrijediti 100 puta u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,0.

Izračunajte volumen bistrog ekstrakta koji je potreban da biste pripremili 2 mL 100 puta razrijeđenog uzorka, te koliko trebate još dodati 50 mM fosfatnog pufera pH 7,0 da bi ukupni volumen iznosio 2 mL.

Izračun

Aktivnost katalaze odrediti prema sljedećoj shemi:

Otopine	SP* (μL)	GP** (μL)
20 mM H ₂ O ₂	500	500
50 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,0	500	400
Uzorak	-	100

Promućkati inverzijom i mjeriti promjenu apsorbancije pri **240 nm** svakih 10 s tijekom 100 s***

* SP – slijepa proba – reakcijska smjesa za kontrolu spontanog raspada vodikova peroksida

** GP – glavna proba – reakcijska smjesa za određivanje enzimske aktivnosti

*** U slučaju glavne probe po dodatku enzima (uzorka) reakcijsku smjesu u roku od 30 s promućkati inverzijom i započeti mjerenje apsorbancije

U kivetu otpipetirati otopine redoslijedom prikazanim u gornjoj tablici. Kivetu prekriti parafilmom, promućkati inverzijom, te potom mjeriti promjenu apsorbancije pri 240 nm u spektrofotometru svakih 10 s tijekom 100 s.

Iz dobivenih podataka izračunati promjenu apsorbancije za glavnu i slijepu probu prema sljedećoj formuli:

$$\Delta A_{240\text{nm}} = A_{240\text{nm}}(t=0 \text{ s}) - A_{240\text{nm}}(t=100 \text{ s})$$

te izraziti promjenu apsorbancije po minuti prema sljedećoj formuli:

$$\Delta A_{240\text{nm}}/\text{min} = \Delta A_{240\text{nm}} \times 60 \text{ s}/100\text{s}$$

Napomena: Za izračun promjene apsorbancije bitno je da je krivulja ovisnosti promjene apsorbancije o vremenu linearna.

Aktivnost enzima potom izračunati prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost katalaze (U/mL)} = \frac{[\Delta A/\text{min}(SP) - \Delta A/\text{min}(GP)]}{V \times 0,0436} \times d \times 1$$

gdje je:

d – faktor razrijeđenja uzorka

V – volumen enzima dodanog u reakciju (mL)

1 – ukupni volumen reakcijske smjese

0,0436 – molarni apsorpcijski koeficijent vodikova peroksida

Napomena: Internacionalna jedinica (U) je jedinica enzimske aktivnosti koja predstavlja onu količinu enzima koja razgradi 1 μmol supstrata po 1 minuti (U = μmol/min). Znači izračunom aktivnosti katalaze u U/mL već ste izračunali i aktivnost enzima u μmol/min mL.

Aktivnost enzima potom preračunati u specifičnu aktivnost (SA) prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost katalaze (U/mg)} = \frac{\text{Aktivnost (U/mL)}}{\text{Koncentracija proteina (mg/mL)}}$$

odnosno

$$\text{Aktivnost katalaze (}\mu\text{mol/min mg)} = \frac{\text{Aktivnost (}\mu\text{mol/min mL)}}{\text{Koncentracija proteina (mg/mL)}}$$

REZULTATI MJERENJA

Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom

Uzorak	$\Delta A_{595\text{nm}}$
Paralela 1	
Paralela 2	
Paralela 3	
Srednja vrijednost ($\overline{\Delta A_{595\text{nm}}}$)	

Izračun količine proteina u nepoznatom uzorku

Uzorak	V(uzorka)/ μL	$\overline{\Delta A_{595\text{nm}}}$	$\mu\text{g BSA}$	R*	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Ekstrakt pileće jetre					

* R = razrijeđenje; upisati koliko je puta uzorak azrijeđen

Izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 240 nm

	Apsorbancija pri 240 nm	
t/s	SP	GP
t = 0 s		
t = 100 s		
Izračun		
ΔA		
$\Delta A/\text{min}$		

Izračun aktivnosti enzima

Aktivnost katalaze

U/mL	$\mu\text{mol/min mL}$	U/mg	$\mu\text{mol/min mg}$

Zaključak	
------------------	--

Definirajte što je to U.

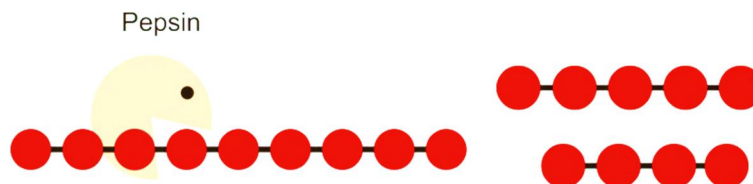
--

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Vježba 5. Određivanje aktivnosti pepsina testom fiksnog vremena

Svrha vježbe: Upoznati se sa postupkom određivanja aktivnosti enzima testom fiksnog vremena te načinima izražavanja enzimске aktivnosti.

Pepsin, EC 3.4.23.1., je enzim probavnog trakta, kojeg u želudac luče stanice stjenke želuca u obliku inaktivnog preteče – pepsinogena, a koji potom u želucu pod djelovanjem niskog pH (1,2-3) prelazi u aktivni oblik (pepsin). Ovaj enzim cijepa peptidnu vezu unutar polipeptidnog lanca na amino- i karboksilnoj strani aromatskih i alifatskih aminokiselina preferirajući aminokiseline Tyr, Phe i Leu (**Slika 10**).



Slika 10. Hidrolitička aktivnost pepsina

Određivanje aktivnosti pepsina najčešće se provodi indirektno, spektrofotometrijskim određivanjem količine oslobođenih amino skupina nakon određenog vremena enzimске reakcije (test fiksnog vremena). U ovoj će se vježbi za određivanje slobodnih amino skupina koristiti OPA reagens.

Zadatak vježbe: Testom fiksnog vremena odrediti aktivnost pepsina. Aktivnost enzima izraziti u nmol/min mL te nmol/min mg.

Reagensi

Otopina pepsina - pepsin otopljen u 0,05 M HCl pH = 1,5, $\gamma(\text{proteina}) = 0,66 \text{ mg/mL}$

Otopina hemoglobina - hemoglobin otopljen u 0,05 M HCl pH = 1,5, $\gamma(\text{proteina}) = 20 \text{ mg/mL}$

4 % otopina trikloroctene kiseline

Destilirana voda

Otopina natrijeva tetraborata ($c = 0,1 \text{ mol/L}$; pH = 11)

OPA reagens (0,8 mg/mL o-ftaldialdehid, 1 mg/mL ditiotreitol, 2 % metanol, 1 % natrijev dodecil-sulfat u 0,1 M natrijevom tetraborat dodekahidratu, pH=9,7-10)

Pribor

Centrifuga

Epruvete za centrifugiranje (10 mL)

Stalak za epruvete

UV/VIS spektrofotometar

Mikropipete 10-100; 100-1000 μL , 1-5 mL

PMMA kivete

Stalak za kivete

Štoperica

Postupak

U epruvetama za centrifugiranje (10 mL) pripremiti reakcijsku smjesu u nultoj minuti i glavnu probu prema dolje prikazanoj tablici te inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi:

Otopine	RSNM* (μL)	GP** (μL)
Otopina hemoglobina ($\gamma = 20 \text{ mg/mL}$)	1000	1000
4 % trikloroctena kiselina	2000	-
Otopina pepsina ($\gamma = 0.66 \text{ mg/mL}$)	200	200
Inkubirati na sobnoj temperaturi 10 minuta		
4 % trikloroctena kiselina	-	2000
Destilirana voda	1800	1800

* RSNM – reakcijska smjesa u nultoj minuti (često se zove i slijepa proba)

** GP – glavna proba – reakcijska smjesa za određivanje enzimске aktivnosti

Po isteku zadanog vremena inkubacije, u glavnoj probi prekinuti reakciju dodatkom 4 % trikloroctene kiseline, te uzorke centrifugirati pri 5000 obrtaja/min (rpm) tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Bistri ekstrakt potom odvojiti od taloga dekantiranjem u staklenu epruvetu, te koristiti za određivanje količine slobodnih amino skupina.

Prije određivanja slobodnih amino skupina potrebno je pripremiti željeno razrijeđenje uzorka (bistrog ekstrakta) u 0,1 M otopini natrijeva tetraborata prema sljedećoj tablici:

Otopine	RSNM (μL)	GP (μL)
Bistri ekstrakt	1000	1000
0,1 M natrijev tetraborat	1000	1000

Tako razrijeđeni ekstrakt potom koristiti za određivanje slobodnih amino skupina. U kivete otpipetirati otopine redoslijedom prikazanim u donjoj tablici. Kivetu prekriti parafilmom, promućkati inverzijom, te nakon 2 minute izmjeriti apsorbanciju pri 340 nm.

Otopine	SP* (μL)	RSNM (μL)	GP ₁ (μL)	GP ₂ (μL)	GP ₃ (μL)
0,1 M natrijev tetraborat	100	-	-	-	-
Razrijeđeni bistri ekstrakt	-	100	100	100	100
OPA reagens**	1000	1000	1000	1000	1000

Promiješati inverzijom i nakon 2 minute inkubacije na sobnoj temperaturi izmjeriti apsorbanciju otopine pri 340 nm

* SP – slijepa proba – služi za „zeroiranje“ spektrofotometra

** OPA reagens je potrebno dodati uz razmak od 15 s između kiveta

Iz dobivenih podataka prvo izračunati razliku apsorbancije između glavne probe i reakcijske smjese u nultoj minuti prema sljedećoj formuli:

$$\Delta A_{340\text{nm}} = A_{340\text{nm}}(\text{GP}) - A_{340\text{nm}}(\text{RSNM})$$

te izraziti promjenu apsorbancije po minuti prema sljedećoj formuli:

$$\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min} = \Delta A_{340\text{nm}}/10 \text{ min}$$

Aktivnost enzima potom izračunati prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost pepsina (nmol/min mL)} = \frac{[\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min} \times 2 \times 1,1 \times 5 \times 2,437]}{V}$$

gdje je:

2 – faktor razrijeđenja uzorka

V – volumen enzima dodanog u reakciju (mL)

5 – ukupni volumen reakcijske smjese

1,1 – ukupni volumen u kivetu

2,437 – faktor za izračun količine slobodnih amino skupina

Aktivnost enzima potom preračunati u specifičnu aktivnost (SA) prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost pepsina (nmol/min mg)} = \frac{\text{Aktivnost (nmol/min mL)}}{\text{Koncentracija pepsina (mg/mL)}}$$

REZULTATI MJERENJA

Izmjerene vrijednosti apsorbancije

Uzorak	A _{340nm}	ΔA _{340nm}	ΔA _{340nm} /min
RSNM		-	
GP ₁			
GP ₂			
GP ₃			
Srednja vrijednost glavne probe ($\overline{GP}$)			

Izračun aktivnosti pepsina

Aktivnost pepsina

nmol/min mL	nmol/min mg

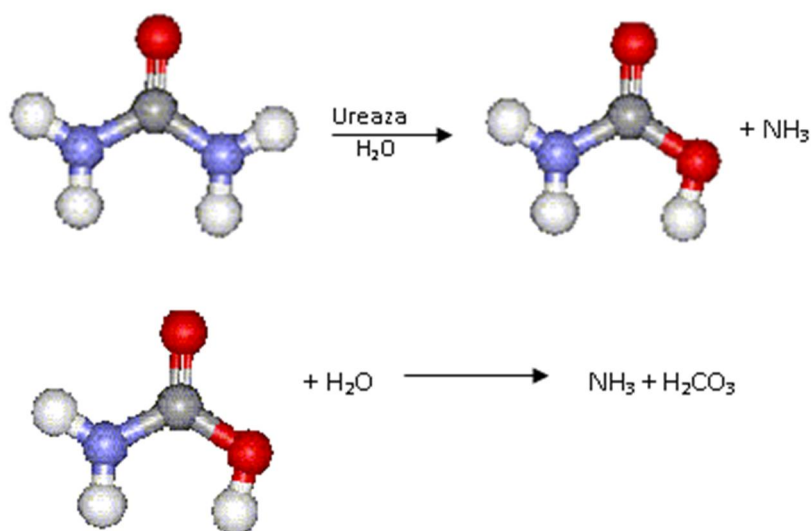
Zaključak	
------------------	--

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Vježba 6. Određivanje aktivnosti ureaze testom fiksnog vremena

Svrha vježbe: Upoznati se sa postupkom određivanja aktivnosti enzima testom fiksnog vremena te načinima izražavanja enzimске aktivnosti.

Ureaza, sistematskog naziva urea amidohidrolaza, EC 3.5.1.5, hidrolitički je enzim visoke specifičnosti koji katalizira reakciju hidrolize uree na amonijak i karbamat. Nastali karbamat zatim spontano hidrolizira dajući još jednu molekulu amonijaka i karbonatne kiseline (**Slika 11**).



Slika 11. Enzimská hidroliza uree

Karbonatna kiselina i 2 molekule amonijaka u otopini uspostavljaju ravnotežu svojih protoniranih i disociranih oblika, što dovodi do povišenja pH vrijednosti otopine iz neutralnog u lužnato. Upravo se ovo povišenje pH otopine, nastalo kao rezultat oslobađanja amonijaka tijekom enzimské hidrolize uree koristi za indirektno određivanje aktivnosti ureaze titracijom reakcijske smjese nakon prekida enzimské reakcije. Reakcijska smjesa se titrira pomoću kloridne kiseline, te se na osnovi utroška kloridne kiseline određuje količina nastalog amonijaka i računa enzimská aktivnost.

Zadatak vježbe: Pripremiti otopinu ureaze masene koncentracije 3 mg/mL u 100 mM Tris-HCl puferu pH 7,6 sa 30 mM EDTA i 0,1 % Triton X-100. Testom fiksnog vremena odrediti aktivnost ureaze. Aktivnost enzima izraziti u $\mu\text{mol}/\text{min mL}$, U/mL, $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ i U/mg.

Reagensi

Ureaza

100 mM Tris-HCl pufer pH 7,6 sa 30 mM EDTA i 0,1 % Triton X-100

50 mM urea u 25 mM Tris-HCl puferu pH 7,0

25 mM HCl

2 % otopina HgCl₂

Tashiro indikator

Pribor

Laboratorijska vaga
Lađica za vaganje
Špatula
Reagens boca s navojem i čepom (10 mL)
Elektromagnetska mješalica
Pipeta od 1 i 10 mL
Automatska bireta
Erlenmeyer tikvice 25 mL

Postupak

Određenu količinu ureaze koja je potrebna da bi se pripremilo 10 mL otopine ureaze masene koncentracije 3 mg/mL, izvagati u plastičnoj lađici, kvantitativno prenijeti u reagens bočicu te dodati 10 mL 100 mM Tris-HCl pufera pH 7,6 sa 30 mM EDTA i 0,1 % Triton X-100. Enzim otopiti miješanjem na elektromagnetskoj mješalici te koristiti za određivanje aktivnosti.

Izračun potrebne odvage ureaze	
---	--

U erlenmeyerovim tikvicama (25 mL) pripremiti reakcijsku smjesu u nultoj minuti (RSNM) i glavne probe prema dolje prikazanoj tablici te inkubirati 15 minuta na sobnoj temperaturi:

Otopine	RSNM	GP ₁	GP ₂	GP ₃
50 mM urea u 25 mM Tris-HCl puferu pH 7,0/mL	10	10	10	10
2 % otopina HgCl ₂ /kapi	5	-	-	-
Otopina ureaze ($\gamma = 3$ mg/mL)/mL	1	1	1	1
Inkubirati na sobnoj temperaturi 15 minuta				
2 % otopina HgCl ₂ /kapi	-	5	5	5

Po završetku inkubacije u glavnim probama prekinuti reakciju dodatkom 5 kapi 2 % otopine HgCl₂. Potom u tikvice dodati 5 kapi Tashiro indikatora (indikator dodati samo u tikvicu koja se titrira), te titracijom s 25 mM HCl odrediti količinu razvijenog amonijaka.

Po dodatku Tashiro indikatora boja u tikvicama je zelenkasta. Titracija se provodi do promjene boje iz zelene u ljubičastu.

Rezultate korigirati za vrijednost reakcijske smjese u nultoj minuti, te izračunati aktivnost enzima u $\mu\text{mol/min mL}$, U/mL , $\mu\text{mol/min mg}$ i U/mg .

REZULTATI MJERENJA

Količina utrošenog HCl

Uzorak	V(25 mM HCl)/mL	$\Delta V(25 \text{ mM HCl})/\text{mL}^*$	$n(\text{NH}_3)/\mu\text{mol}^{**}$
RSNM		-	
GP ₁			
GP ₂			
GP ₃			
Srednja vrijednost glavne probe ($\overline{GP}$)			

* ΔV izračunati oduzimanjem volumena utrošenog HCl za RSNM od volumena utrošenog HCl za svaku glavnu probu.

** $n(\text{NH}_3)$ izračunati koristeći se vrijednostima ΔV . Paziti na jedinice!!!!

Izračun aktivnosti enzima

Uzorak	V(enzima)/mL	$\gamma(\text{ureaze})/(\text{mg/mL})$	$n(\text{NH}_3)/\mu\text{mol}$	$\mu\text{mol/min mL}^*$	$\mu\text{mol/min mg}^{**}$
$\overline{GP}$					

* Za izračun enzimske aktivnosti podijeliti vrijednost $n(\text{NH}_3)$ sa volumenom enzima dodanog u reakcijsku smjesu i vremenom inkubacije.

** Za izračun podijeliti aktivnost enzima izraženu u $\mu\text{mol/min mL}$ sa masenom koncentracijom enzima.

Izračun aktivnosti enzima – prikazati izračun za podatke u gornjoj tablici

Aktivnost ureaze

U/mL	$\mu\text{mol/min mL}$	U/mg	$\mu\text{mol/min mg}$

Zaključak

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Pretraživanje proteinskih i enzimskih baza podataka

U planiranju istraživanja, kao i pri planiranju i izradi završnih te diplomskih radova, često je neophodno uz osnovnu literaturu i dostupne znanstvene radove pretražiti i različite baze podataka, kako bi se dobila cjelokupna informacija o predmetu istraživanja. Ukoliko je predmet istraživanja nekakav enzim ili protein, ili nekakav metabolički ciklus onda nam na raspolaganju stoje 3 vrlo značajne baze podataka sa sveobuhvatnim informacijama. To su baze podataka: BRENDA, KEGG te Uniprot.

BRENDA (*B*RAunschweig *E*Nzyme *D*Atabase) je enzimska baza podataka koja sadrži skup informacija o metaboličkim enzimima (*Slika 12*). Baza podataka sadrži podatke o najmanje 83 000 različitih enzima iz 9 800 različitih organizama, razvrstanih u približno 4 200 skupina na osnovu klasifikacijskih brojeva enzima (EC). BRENDA uključuje biokemijske i molekularne informacije o enzimima, njihove reakcije i specifičnosti, funkcionalna svojstva enzima, primjenu enzima, enzimsku stabilnost pri različitim uvjetima, informacije o izolaciji i pročišćavanju enzima, kao i poveznice na literaturu te druge baze podataka. Enzimska baza podataka BRENDA je dostupna na internet adresi <http://www.brenda-enzymes.org>.

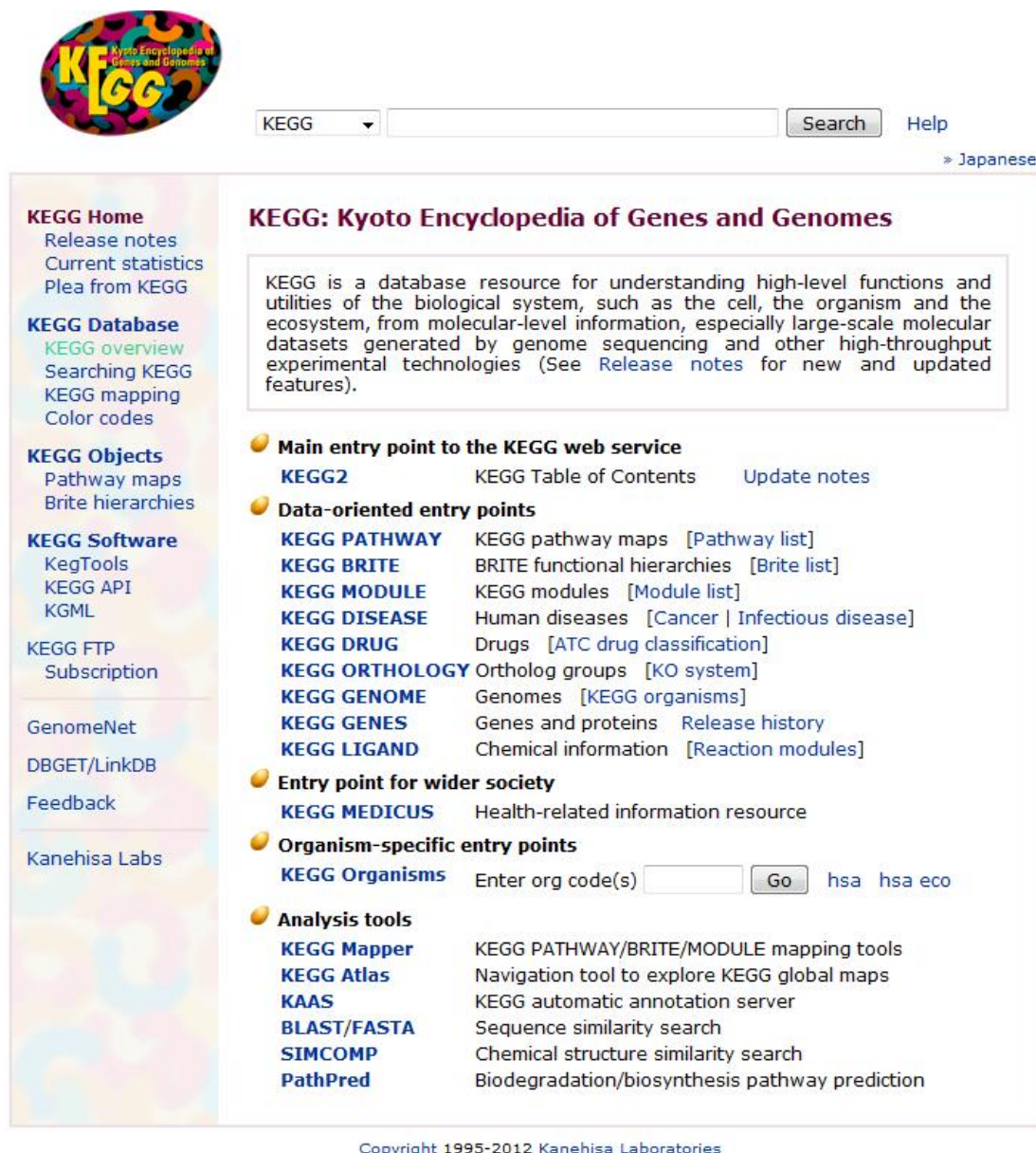
Nomenclature	Reaction & Specificity	Functional Parameters
Enzyme Names EC Number Common/ Recommended Name Systematic Name Synonyms CAS Registry Number	Pathway Catalysed Reaction Reaction Type Natural Substrates and Products Substrates and Products Natural Substrate Products Natural Product Inhibitors Cofactors Metals/Ions Activating Compounds Ligands Biochemicals Reactions Aligned	Km Value kcat/Km Value Ki Value IC50 Value pH Value Turnover Number Specific Activity pH Optimum pH Range Temperature Optimum Temperature Range Kinetic ENzyme Data
Isolation & Preparation		Organism-related information
Purification Cloned Expression Renatured Crystallization		Organism Source Tissue Localization Protein-Specific Search
Stability	Enzyme Structure	Disease & References
pH Stability Temperature Stability General Stability Organic Solvent Stability Oxidation Stability Storage Stability	Sequence/ SwissProt link 3D-Structure/ PDB link Molecular Weight Subunits Posttranslational Modification	Disease/ Diagnostics References
		Application & Engineering
		Engineering Application

Webmaster: Sandra Placzek
s.placzek@tu-bs.de

For access to all features of the website Javascript must be activated, frames enabled and Java (at least version 1.4) has to be installed

Slika 12. Početna web-stranica baze podataka BRENDA

KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) je baza podataka koja sadrži genomske informacije neophodne za razumijevanje funkcioniranja stanica (**Slika 13**). Sastoji se od genomskih, kemijskih i mrežnih informacija. Povezana je sa različitim vanjskim bazama podataka, a sve zajedno daju informacije potrebne za različite visokospecifične molekularno-biološke analize koje dovode do razumijevanja bioloških funkcija. Ukratko, ova baza podataka pomaže pri razumijevanju metaboličkih puteva. Baza podataka KEGG je dostupna na internet adresi <http://www.genome.jp/kegg/>.



Slika 13. Početna web-stranica baze podataka KEGG

UniProt (*The Universal Protein Resource*) je baza podataka sa sveobuhvatnim i sistematskim pristupom informacijama o proteinima, njihovim sekvencama i biološkim funkcijama (**Slika 14**). Baza podataka UniProt je dostupna na internet adresi <http://www.uniprot.org/>.


[Downloads](#) · [Contact](#) · [Documentation/Help](#)

[Search](#)
[Blast](#)
[Align](#)
[Retrieve](#)
[ID Mapping](#)

Search in
Protein Knowledgebase (UniProtKB)

Query

[Search](#)
[Advanced Search »](#)
[Clear](#)

WELCOME

The mission of UniProt is to provide the scientific community with a comprehensive, high-quality and freely accessible resource of protein sequence and functional information.

What we provide

UniProtKB	Protein knowledgebase, consists of two sections: ★ Swiss-Prot, which is manually annotated and reviewed. ★ TrEMBL, which is automatically annotated and is not reviewed. Includes complete and reference proteome sets .
UniRef	Sequence clusters, used to speed up sequence similarity searches.
UniParc	Sequence archive, used to keep track of sequences and their identifiers.
Supporting data	Literature citations, taxonomy, keywords, subcellular locations, cross-referenced databases and more.

Getting started

- [Text search](#)
- [Sequence similarity searches \(BLAST\)](#)
- [Sequence alignments](#)
- [Batch retrieval](#)
- [Database identifier mapping \(ID Mapping\)](#)



NEWS

UniProt release 2013_01 - Jan 9, 2013

Hereditary sensory and autonomic neuropathy type IA: New dietary hope? | UniRef news

- Statistics for UniProtKB:
 - [Swiss-Prot](#) · [TrEMBL](#)
- [Forthcoming changes](#)
- [News archives](#)

Follow @uniprot 515 followers

SITE TOUR



Learn how to make best use of the tools and data on this site.

PROTEIN SPOTLIGHT

a wretched tale

January 2013

We all need guidance in life. And sperm cells are no exception to the rule. In plants, as in all living beings that depend on sex to multiply, a male gamete has to reach a female gamete in order to fuse with it...

Slika 14. Početna web-stranica baze podataka Uniprot

Osnove pretraživanja gore navedenih baza podataka proći ćemo na vježbi 7 u kojoj ćemo detaljnije naučiti pretraživati enzimsku bazu podataka BRENDA.

Vježba 7. Pretraživanje enzimske baze podataka BRENDA

Svrha vježbe: Upoznati se mogućnostima pretraživanja informacija o enzimima u enzimskoj bazi podataka BRENDA.

Zadatak vježbe: Koristeći se enzimskom bazom podataka BRENDA prikupiti informacije i podatke o svojstvima enzima ureaze (*urea amidohidrolaze*) izolirane iz zrna soje (*Glycine max*).

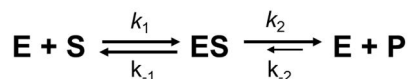
REZULTATI PRETRAŽIVANJA BAZE PODATAKA BRENDA

Enzimska nomenklatura	
EC broj	
Preporučeno ime enzima	
Sistematsko ime enzima	
Interakcija enzim-ligand	
Substrat	
Inhibitori (najmanje 3 inhibitora)	
Kinetički i funkcionalni parametri	
K _m	
V _m	
Specifična aktivnost	
pH optimum	
Optimalna temperatura	
Molekularna masa	

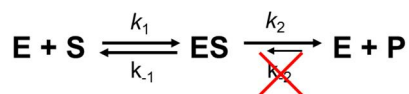
Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Enzimska kinetika

Početkom 20-tog stoljeća Leonor Michaelis i Maud Menten analizirali su kinetiku enzimске reakcije na osnovu jednostavne pretpostavke da za nastanak produkta molekula enzima (E) i molekula supstrata (S) moraju doći u međusoban dodir prije nego dođe do reakcije, odnosno da se supstrat (S) mora vezati u aktivno mjesto enzima (E) pri čemu nastaje kratkoživi enzim-supstrat kompleks (ES). Ovaj kompleks mogu zadesiti dvije sudbine: može disocirati nazad u E i S uz konstantu reakcije (k_{-1}) ili može prijeći u produkt reakcije (P) uz konstantu (k_2):



Michaelis-Mentenin model pretpostavlja mjerenje početne (tzv. inicijalne) brzine enzimске reakcije (v_0), pri kojoj je koncentracija produkta zanemarivo mala te je povratna reakcija pretvorbe produkta u ES kompleks zanemariva, odnosno pri kojoj se povratna reakcija pretvorbe produkta u ES kompleks gotovo i ne dešava ($k_{-2} \ll k_2$):



U takvom jednostavnom slučaju početna brzina enzimске reakcije proporcionalna je koncentraciji ES kompleksa:

$$v_0 = k_2 \times ES$$

Kako je cilj Michaelis-Menteninog modela naći izraz koji povezuje brzine pojedinih reakcija sa poznatom koncentracijom enzima i supstrata, to je potrebno definirati izraze za koncentraciju enzima i supstrata. Koncentraciju enzima možemo izraziti sljedećom formulom:

$$E_0 = E + ES$$

gdje je:

E_0 – ukupna koncentracija enzima,

E – koncentracija slobodnog enzima, a

ES – koncentracija enzim-supstrat kompleksa.

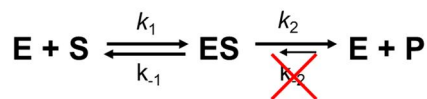
Budući je koncentracija supstrata znatno znatno veća od koncentracije enzima, a time i ES kompleksa, za koncentraciju supstrata (S) pretpostavljamo da je približno jednaka početnoj koncentraciji supstrata ($S \approx S_0$).

Obzirom na postavljene uvjete modela: koncentracija produkta (P) zanemarivo mala, a koncentracija supstrata približno jednaka početnoj koncentraciji supstrata ($S \approx S_0$), proizlazi da se inicijalna brzina mjeri u području ustaljenog stanja enzimске reakcije kojeg karakterizira nepromjenjivost koncentracije ES kompleksa:

$$\frac{dES}{dt} = 0$$

Da bi ovaj izraz bio zadovoljen brzine nastajanja (v_f) i brzine disocijacije ES kompleksa (v_d) moraju biti uravnotežene ($v_f = v_d$).

Promotrimo li opću formulu enzimске reakcije:



vidljivo je da je brzina nastajanja ES kompleksa (v_f) jednaka:

$$v_f = k_2 \times E \times S$$

a brzina disocijacije ES kompleksa (v_d) jednaka:

$$v_d = k_{-1} \times ES + k_3 \times ES$$

Izjednačimo li ove dvije jednačbe, odnosno prihvatimo pretpostavku da brzine nastajanja (v_f) i brzine disocijacije ES kompleksa (v_d) moraju biti uravnotežene ($v_f = v_d$), tada dobijamo izraz:

$$k_2 \times E \times S = k_{-1} \times ES + k_3 \times ES$$

čijim preuređivanjem dobijemo jednačbu:

$$E = \frac{k_{-1} + k_3}{k_1} \times \frac{1}{S} \times ES$$

Tri konstante brzine reakcije (k_1 , k_{-1} , k_3) u gornjoj jednačbi mogu se izraziti novom konstantom koju nazivamo Michaelisova konstanta (K_m):

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_3}{k_1}$$

te se jednačba onda može pisati:

$$E = K_m \times \frac{1}{S} \times ES$$

Uvrstimo li ovu jednačbu u izraz za ukupnu količinu enzima ($E_0 = E + ES$) dobijemo jednačbu:

$$E_0 = K_m \times \frac{1}{S} \times ES + ES = ES \times \left(1 + \frac{K_m}{S}\right)$$

Ukoliko iz ove jednačbe izrazimo koncentraciju ES kompleksa, dobijemo jednačbu:

$$ES = \frac{E_0}{1 + \frac{K_m}{S}} = \frac{E_0}{\frac{S + K_m}{S}}$$

Uvrstimo li ovu jednačbu u izraz za početnu brzinu enzimске reakcije ($v_0 = k_2 \times ES$), dobijemo jednačbu:

$$v = k_2 \times \frac{E_0}{\frac{S + K_m}{S}} = \frac{k_2 \times E_0 \times S}{S + K_m}$$

čijim preuređivanjem dobijemo Michaelis-Mentenovu jednačbu za brzinu enzimске reakcije (v):

$$v = \frac{V_m \times S}{K_m + S}$$

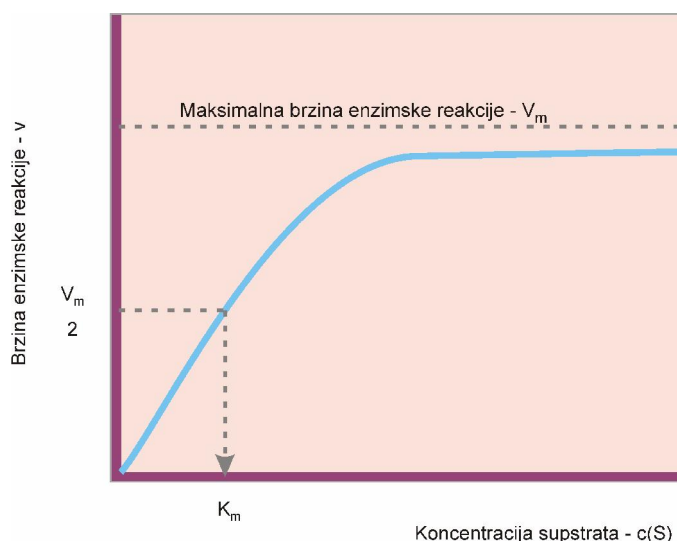
gdje je:

V_m – maksimalna brzina enzimске reakcije ($V_m = k_2 \times E_0$) izražena kao umnožak konstante brzine reakcije (k_2) i ukupne koncentracije enzima (E_0),

K_m – Michaelisova konstanta, a

S – koncentracija supstrata.

Krivulja koja opisuje Michaelis-Menteninu jednadžbu je hiperbola, i velik dio enzima za koji se određuje ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata pokazuje upravo ovakav oblik krivulje (**Slika 15**).



Slika 15. Dijagram ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata – Michaelis-Mentenin dijagram

Iz slike je vidljivo da pri niskim koncentracijama S , kada je koncentracija supstrata znatno manja od vrijednosti Michaelisove konstante ($S \ll K_m$) brzina enzimske reakcije raste proporcionalno sa povećanjem koncentracije supstrata, dok pri visokim koncentracijama supstrata, kada je $S \gg K_m$, brzina ne ovisi o koncentraciji supstrata, već dostiže maksimalnu vrijednost

Određivanje kinetičkih parametara K_m i V_m bitno je za opisivanje enzimski kataliziranih reakcija. Međutim, kako se iz hiperbole ne mogu baš najpreciznije očitati, niti iz jednadžbe hiperbole vrlo jednostavno izračunati vrijednosti tih dviju konstanti, uveden je mnogo prikladniji način za izračun i/ili očitavanje ovih dviju parametara, a to je linearizacija hiperbole.

Promotrimo li Michaelis-Menteninu jednadžbu, kao i njen grafički prikaz (**Slika 15**):

$$v = \frac{V_m \times S}{K_m + S}$$

tada možemo uočiti da su V_m i K_m konstante, a v i S promijenjivi parametri te ih možemo promatrati kao vrijednosti ordinate ($y = v$) i apscise ($x = S$). Da bismo ovu jednadžbu linearizirali potrebno je riješiti se zbroja u nazivniku ($K_m + S$), a to ćemo najjednostavnije postići inverzijom čitave jednadžbe

$$\left(v = \frac{V_m \times S}{K_m + S} \right)^{-1}$$

pri čemu se dobije sljedeći izraz

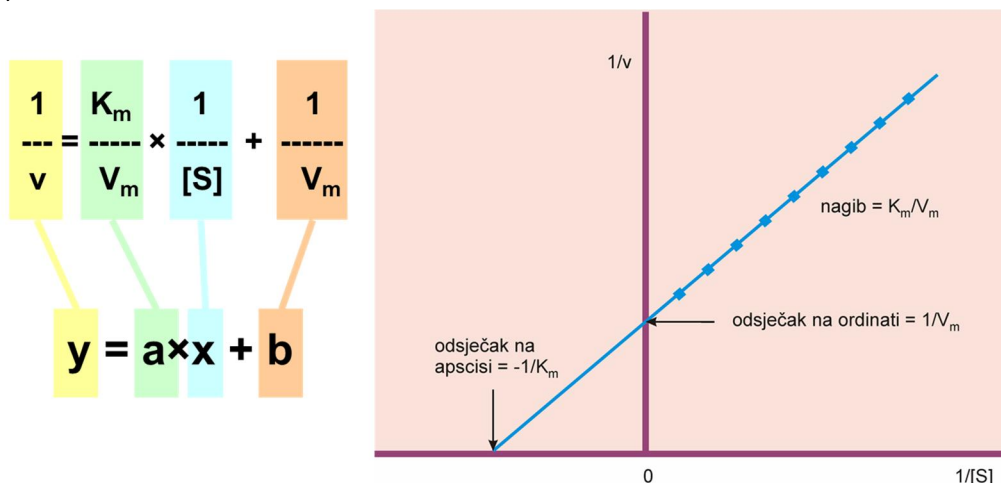
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + S}{V_m \times S}$$

čijim daljnim preuređivanjem dobijemo izraz za jednadžbu pravca:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m \times S} + \frac{S}{V_m \times S} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$

koji nam daje linearnu ovisnost recipročne vrijednosti brzine enzimske reakcije o recipročnoj vrijednosti koncentracije supstrata.

Grafički prikaz ove jednadžbe nazivamo dvostruko recipročni ili Lineveawer-Burkov dijagram (**Slika 16**).



Slika 16. Dvostruko recipročni (Lineveawer-Burk) dijagram

Iz odsječka na ordinati može se očitati recipročna vrijednost maksimalne brzine ($1/V_m$), a iz nagiba pravca omjer Michaelisove konstante i maksimalne brzine (K_m/V_m)

Upravo ćemo u vježbi 10 određivati kinetičke parametre (K_m i V_m) za enzim ureazu i to tako da ćemo mjeriti brzinu enzimske reakcije pri različitim koncentracijama supstrata. Dobivene rezultate mjerenja prikazati ćemo Michaelis-Mentenim i Lineweaver-Burkovim dijagramom, iz kojih ćemo očitati i/ili izračunati vrijednosti K_m i V_m .

Međutim, prije kinetičkih mjerenja biti će potrebno ispitivanjem utjecaja vremena na brzinu enzimske reakcije utvrditi vremenski period u kojem se enzimska reakcija nalazi u ustaljenom stanju, odnosno stanju dinamičke ravnoteže, te ispitivanjem utjecaja pH na brzinu enzimske reakcije odrediti optimalni pH djelovanja ureaze. Ova dva utjecaja na brzinu enzimske reakcije provest ćemo vježbama 8 i 9.

Vježba 8. Vremenski tijek reakcije

Svrha vježbe: Upoznati se sa načinom određivanja ustaljenog stanja enzimske reakcije.

Kako je već prije rečeno, za određivanje kinetičkih parametara enzima potrebno je mjerenje brzine enzimske reakcije provoditi pri ustaljenom stanju, odnosno stanju dinamičke ravnoteže. Ustaljeno stanje enzimske reakcije karakterizira nepromjenjivost koncentracije ES kompleksa. Međutim, kako je ES kompleks kratkoživući (*svega nekoliko nanosekundi*), njegovu koncentraciju je vrlo teško odrediti pri standardnom mjerenju u laboratoriju.

Stoga se postavlja pitanje kako ćemo biti sigurni da se nalazimo u ustaljenom stanju enzimske reakcije, odnosno postoji li još kakav pokazatelj koji nam može pomoći da budemo sigurni da se nalazimo u ustaljenom stanju?

Postoji, jedan od pokazatelja ustaljenog stanja enzimske reakcije je i linearni porast koncentracije produkta u jedinici vremena:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \times t$$

Što to zapravo znači? To znači da grafički prikaz ovisnosti brzine enzimske reakcije (količine nastalog produkta) o vremenu treba biti pravac određenog nagiba.

Upravo ćemo ovom vježbom ustanoviti koliko to dugo možemo provoditi enzimsku reakciju a da nam ovisnost količine nastalog produkta o vremenu bude linearna, odnosno da se nalazimo u ustaljenom stanju enzimske reakcije.

Zadatak vježbe: Odrediti vremenski period u kojem se enzimaska hidrolize uree nalazi u ustaljenom stanju, odnosno stanju dinamičke ravnoteže.

Reagensi

Otopina ureaze ($\gamma = 3 \text{ mg/mL}$)
50 mM urea u 25 mM Tris-HCl puferu pH 7,0
25 mM HCl
2 % otopina HgCl_2
Tashiro indikator

Pribor

Pipeta od 1 i 10 mL
Automatska bireta
Erlenmeyer tikvice 25 mL

Postupak

U erlenmeyerovim tikvicama (25 mL) pripremiti reakcijsku smjesu u nultoj minuti (RSNM) i glavne probe prema dolje prikazanoj tablici te inkubirati određeno vrijeme na sobnoj temperaturi:

Otopine	RSNM	GP ₁	GP ₂	GP ₃	GP ₄	GP ₅
50 mM urea u 25 mM Tris-HCl puferu pH 7,0/mL	10	10	10	10	10	10
2 % otopina HgCl ₂ /kapi	5	-	-	-	-	-
Otopina ureaze ($\gamma = 3$ mg/mL)/mL	1	1	1	1	1	1
Vrijeme inkubacije	0	5	10	15	20	25
2 % otopina HgCl ₂ /kapi	-	5	5	5	5	5

Po završetku inkubacije u glavnim probama prekinuti reakciju dodatkom 5 kapi 2 % otopine HgCl₂. Potom u tikvice dodati 5 kapi Tashiro indikatora, te titracijom s 25 mM HCl odrediti količinu razvijenog amonijaka.

Po dodatku Tashiro indikatora boja u tikvicama je zelenkasta. Titracija se provodi do promjene boje iz zelene u ljubičastu.

Rezultate korigirati za vrijednost reakcijske smjese u nultoj minuti, te izračunati aktivnost enzima u $\mu\text{mol/min mL}$, U/mL , $\mu\text{mol/min mg}$ i U/mg .

Grafički prikazati ovisnost količine nastalog amonijaka o vremenu, te ovisnost enzimске aktivnosti (U/mL) o vremenu. Na osnovi grafičkih prikaza odrediti vremenski period ustaljenog stanja enzimске reakcije.

REZULTATI MJERENJA

Uvjeti provođenja enzimске reakcije

$\gamma(\text{ureaze})/(\text{mg/mL})$	$c(\text{uree})/\text{mmol}$	pH otopine uree	T/°C

Količina utrošenog HCl

Uzorak	t/min	V(25 mM HCl)/mL	$\Delta V(25 \text{ mM HCl})/\text{mL}^*$	$n(\text{NH}_3)/\text{mmol}^{**}$
RSNM			-	
GP ₁				
GP ₂				
GP ₃				
GP ₄				
GP ₅				

* ΔV izračunati oduzimanjem volumena utrošenog HCl za RSNM od volumena utrošenog HCl za svaku glavnu probu.

** $n(\text{NH}_3)$ izračunati koristeći se vrijednostima ΔV . Paziti na jedinice!!!!

Izračun aktivnosti enzima

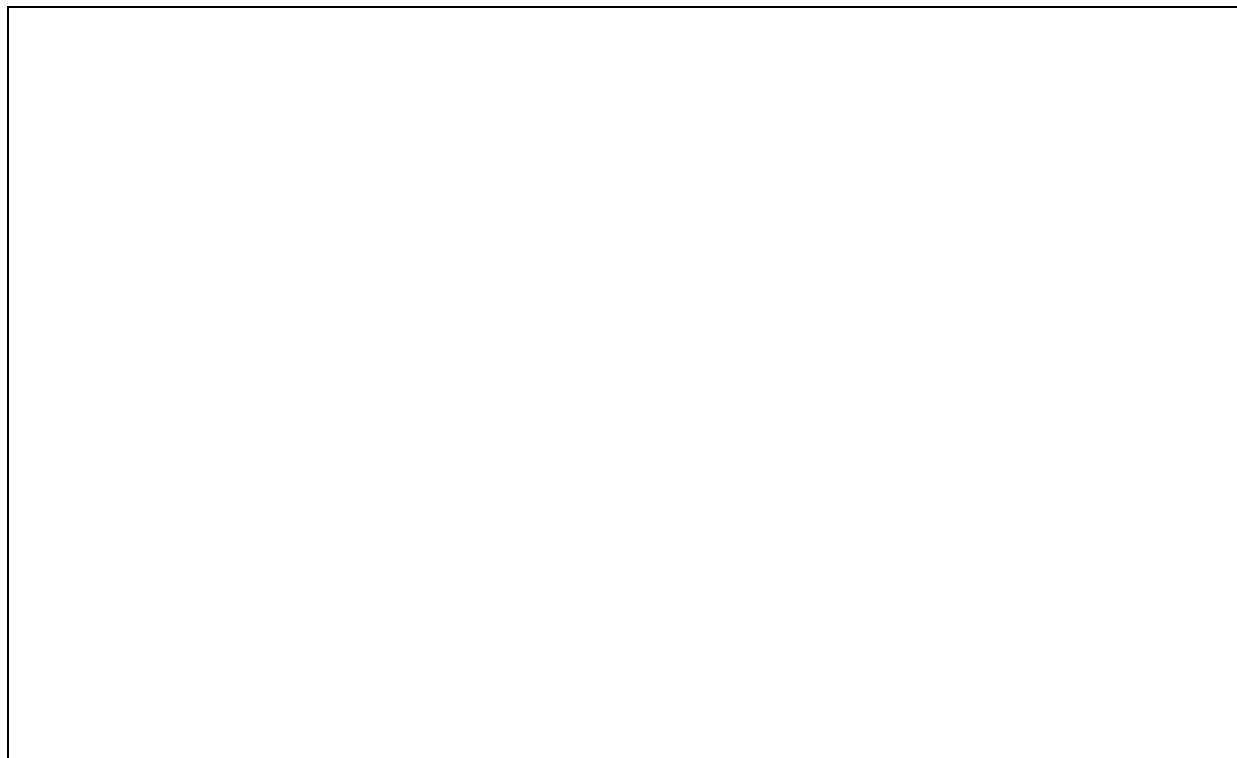
t/min	V(enzima)/mL	$\gamma(\text{ureaze})/(\text{mg/mL})$	$n(\text{NH}_3)/\text{mmol}$	$\mu\text{mol/min mL}^*$	$\mu\text{mol/min mg}^{**}$
5					
10					
15					
20					
25					

* Za izračun enzimске aktivnosti podijeliti vrijednost $n(\text{NH}_3)$ sa volumenom enzima dodanog u reakcijsku smjesu i vremenom inkubacije.

**Za izračun podijeliti aktivnost enzima izraženu u $\mu\text{mol/min mL}$ sa masenom koncentracijom enzima.

Aktivnost ureaze

t/min	U/mL	$\mu\text{mol/min mL}$	U/mg	$\mu\text{mol/min mg}$
5				
10				
15				
20				
25				

Grafički prikaz ovisnosti količine nastalog amonijaka o vremenu inkubacije

Grafički prikaz ovisnosti enzimske aktivnosti o vremenu inkubacije

Zaključak	
------------------	--

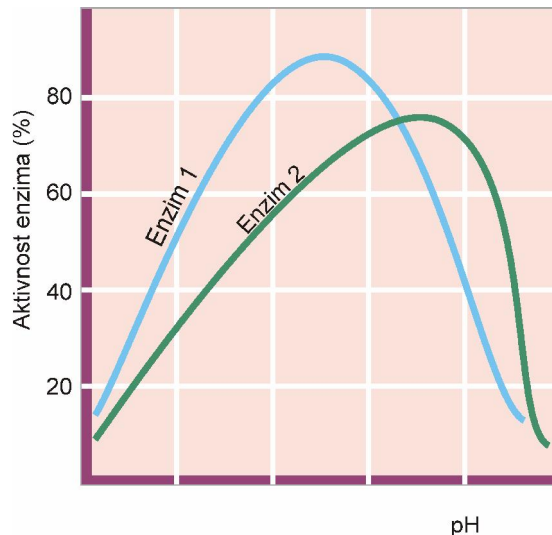
Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Vježba 9. Utjecaj pH na brzinu enzimske reakcije

Svrha vježbe: Upoznati se sa načinom određivanja optimalnog pH djelovanja enzima.

Kako je već prije rečeno, za određivanje kinetičkih parametara enzima potrebno je mjerenje brzine enzimske reakcije provoditi pri optimalnom pH. Optimalni pH je onaj pH pri kojem enzim pokazuje maksimalnu aktivnost.

Naime, svaki enzim posjeduje optimalni pH pri kojem je najaktivniji, odnosno postiže maksimalnu aktivnost uz određeni supstrat, a koja se sniženjem ili povišenjem pH značajno smanjuje (**Slika 17**). Ovisnost enzimske aktivnosti o pH posljedica je utjecaja pH otopine na ionizacijsko stanje bočnih ogranaka aminokiselina u afinitetnom i katalitičkom mjestu enzima, te ionizacije i naboja ionizacijskih skupina supstrata.



Slika 17. Ovisnost brzine enzimske reakcije o pH otopine

U ovoj ćemo vježbi odrediti optimalni pH enzimske hidrolize uree.

Zadatak vježbe: Odrediti utjecaj pH na aktivnost ureaze, te definirati optimalni pH djelovanja ovog enzima.

Reagensi

Otopina ureaze ($\gamma = 3 \text{ mg/mL}$)
50 mM urea u 25 mM Tris-HCl puferu pH 5, 6, 7, 8 i 9
25 mM HCl
2 % otopina HgCl_2
Tashirol indikator

Pribor

Pipeta od 1 i 10 mL
Automatska bireta
Erlenmeyer tikvice 25 mL

Postupak

U erlenmeyerovim tikvicama (25 mL) pripremiti reakcijske smjese u nultoj minuti i glavne probe prema dolje prikazanoj tablici te inkubirati određeno vrijeme na sobnoj temperaturi:

Otopine	RSN M ₁	GP ₁	RSN M ₂	GP ₂	RSN M ₃	GP ₃	RSN M ₄	GP ₄	RSN M ₅	GP ₅
50 mM urea u 25 mM Tris-HCl puferu /mL	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
pH otopine uree	5		6		7		8		9	
2 % otopina HgCl ₂ /kapi	5	-	5	-	5	-	5	-	5	-
Otopina ureaze ($\gamma = 3 \text{ mg/mL}$)/mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Inkubirati na sobnoj temperaturi određeno vrijeme*										
2 % otopina HgCl ₂ /kapi	-	5	-	5	-	5	-	5	-	5

* vrijeme inkubacije je određeno u vježbi 8.

Po završetku inkubacije, u glavnim probama prekinuti reakciju dodatkom 5 kapi 2 % otopine HgCl₂. Potom u tikvice dodati 5 kapi Tashiro indikatora, te titracijom s 25 mM HCl odrediti količinu razvijenog amonijaka.

Rezultate korigirati za vrijednost reakcijskih smjesa u nultoj minuti, te izračunati aktivnost enzima u $\mu\text{mol/min mL}$, U/mL, $\mu\text{mol/min mg}$ i U/mg.

Grafički prikazati ovisnost enzimске aktivnosti (U/mL) o pH, te odrediti optimalni pH djelovanja enzima.

REZULTATI MJERENJA

Uvjeti provođenja enzimске reakcije

$\gamma(\text{ureaze})/(\text{mg/mL})$	c(uree)/mmol	T/°C	t/min

Količina utrošenog HCl

Uzorak	pH	V(25 mM HCl)/mL	$\Delta V(25 \text{ mM HCl})/\text{mL}$	n(NH ₃)/mmol
GP ₁				
RSNM ₁				
GP ₂				
RSNM ₂				
GP ₃				
RSNM ₃				
GP ₄				
RSNM ₄				
GP ₅				
RSNM ₅				

Izračun aktivnosti enzima

pH	V(enzima)/mL	$\gamma(\text{ureaze})/(\text{mg/mL})$	$n(\text{NH}_3)/\text{mmol}$	$\mu\text{mol/min mL}$	$\mu\text{mol/min mg}$
5					
6					
7					
8					
9					

Aktivnost ureaze

pH	U/mL	$\mu\text{mol/min mL}$	U/mg	$\mu\text{mol/min mg}$
5				
6				
7				
8				
9				

Grafički prikaz ovisnosti enzimске aktivnosti o pH
Zaključak*

* pri pisanju zaključka usporediti optimalni pH dobiven vježbom, sa optimalnim pH pronađenim za ureazu pretraživanjem enzimске baze podataka BRENDA u vježbi 7.

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Vježba 10. Utjecaj koncentracije supstrata na brzinu enzimske reakcije

Svrha vježbe: Upoznati se sa načinima određivanja kinetičkih parametara enzima: maksimalne brzine enzimske reakcije i Michaelisove konstante.

Zadatak vježbe: Odrediti kinetičke parametre enzimske hidrolize uree - maksimalnu brzinu (V_m) i Michaelisovu konstantu (K_m).

Reagensi

Otopina ureaze ($\gamma = 3 \text{ mg/mL}$)

Otopine uree (5, 10, 20, 40, 50 mM) u 25 mM Tris-HCl puferu pH 7

25 mM HCl

2 % otopina HgCl_2

Tashiro indikator

Pribor

Pipeta od 1 i 10 mL

Automatska bireta

Erlenmeyer tikvice 25 mL

Postupak

U erlenmeyerovim tikvicama (25 mL) pripremiti reakcijske smjese u nultoj minuti i glavne probe prema dolje prikazanoj tablici te inkubirati određeno vrijeme na sobnoj temperaturi:

Otopine	RSN M_1	GP ₁	RSN M_2	GP ₂	RSN M_3	GP ₃	RSN M_4	GP ₄	RSN M_5	GP ₅
urea u 25 mM Tris-HCl puferu/mL	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
koncentracija uree/mM	5		10		20		40		50	
2 % otopina HgCl_2 /kapi	5	-	5	-	5	-	5	-	5	-
Otopina ureaze ($\gamma = 3 \text{ mg/mL}$)/mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Inkubirati na sobnoj temperaturi određeno vrijeme*										
2 % otopina HgCl_2 /kapi	-	5	-	5	-	5	-	5	-	5

* vrijeme inkubacije je određeno u vježbi 8.

Po završetku inkubacije u glavnim probama prekinuti reakciju dodatkom 5 kapi 2 % otopine HgCl_2 . Potom u tikvice dodati 5 kapi Tashiro indikatora te titracijom s 25 mM HCl odrediti količinu razvijenog amonijaka.

Rezultate korigirati za vrijednost reakcijskih smjesa u nultoj minuti, te izračunati aktivnost enzima u $\mu\text{mol/min mL}$, U/mL , $\mu\text{mol/min mg}$ i U/mg .

Grafički prikazati ovisnost enzimske aktivnosti (U/mL) o koncentraciji supstrata Michaelis-Mentenim i Lineweaver-Burkovim dijagramom. Iz oba dijagrama očitati ili izračunati vrijednosti K_m i V_m . Način očitavanja proučiti na slikama 15 i 16.

Linearnom regresijom podataka u dvostruko recipročnom dijagramu odrediti jednadžbu pravca te iz jednadžbe pravca izračunati vrijednosti K_m i V_m .

REZULTATI MJERENJA

Uvjeti provođenja enzimske reakcije

$\gamma(\text{ureaze})/(\text{mg/mL})$	pH otopine uree	T/°C	t/min

Količina utrošenog HCl

Uzorak	c(urea)/mM	V(25 mM HCl)/mL	$\Delta V(25 \text{ mM HCl})/\text{mL}$	n(NH ₃)/mmol
GP ₁				
RSNM ₁				
GP ₂				
RSNM ₂				
GP ₃				
RSNM ₃				
GP ₄				
RSNM ₄				
GP ₅				
RSNM ₅				

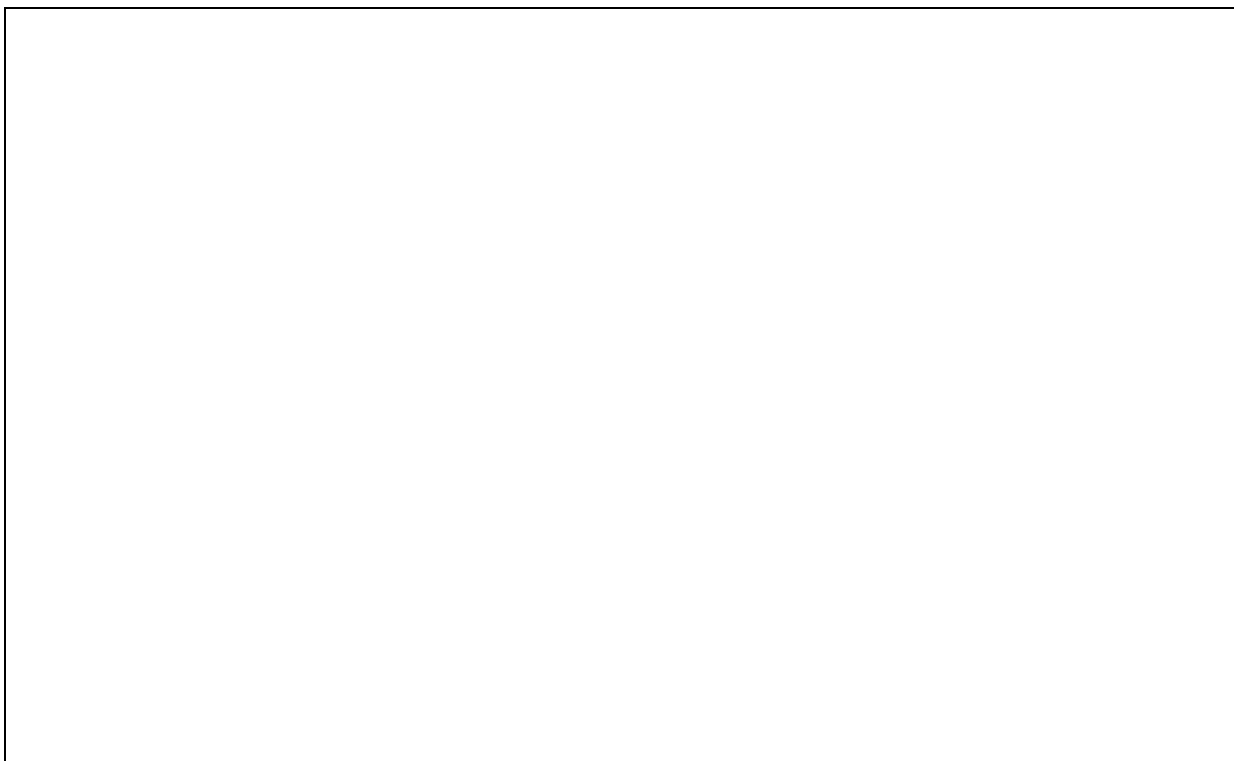
Izračun aktivnosti enzima

c(urea)/mM	V(enzima)/mL	$\gamma(\text{ureaze})/(\text{mg/mL})$	n(NH ₃)/mmol	$\mu\text{mol/min mL}$	$\mu\text{mol/min mg}$

Aktivnost ureaze

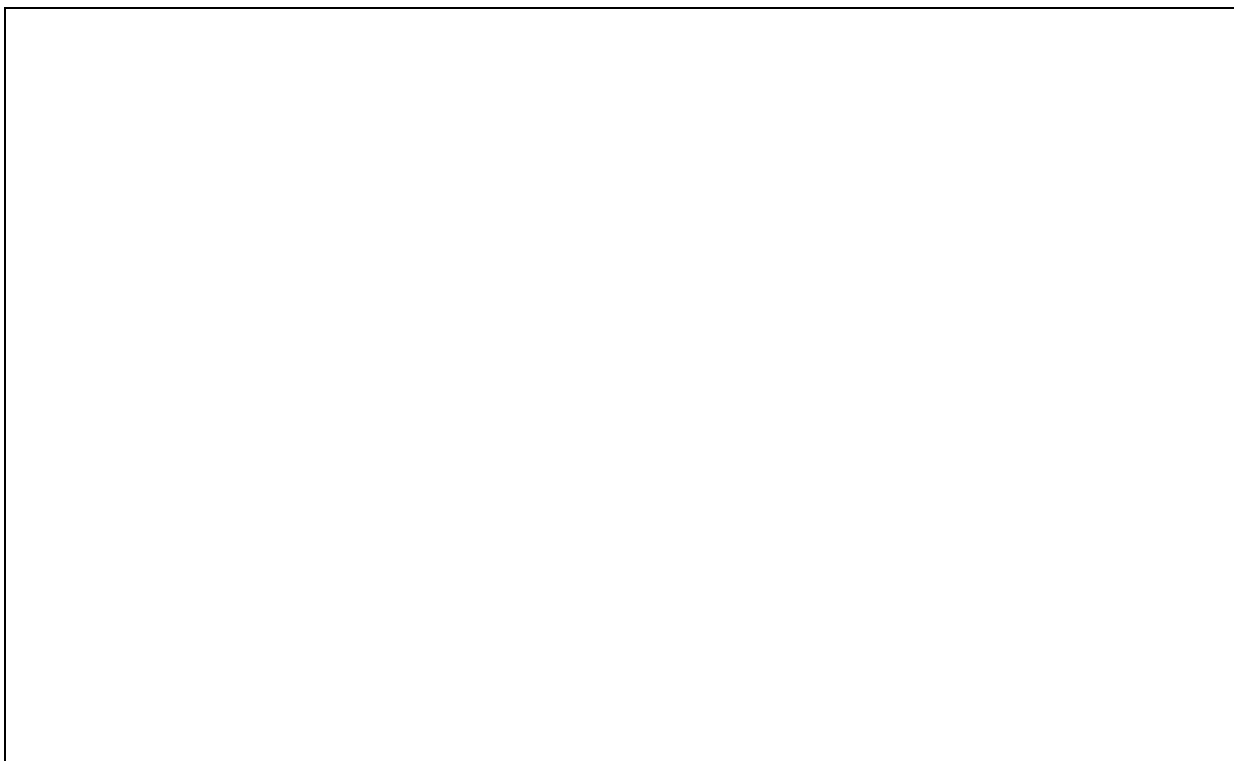
c(urea)/mM	U/mL	$\mu\text{mol/min mL}$	U/mg	$\mu\text{mol/min mg}$

Grafički prikaz ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata



K_m		V_m	
-------	--	-------	--

Dvostruko recipročni dijagram ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata



K_m		V_m	
-------	--	-------	--

Izračun K_m i V_m vrijednosti iz jednadžbe pravca

--

K_m		V_m	
-------------------------	--	-------------------------	--

Zaključak*	
-------------------	--

** pri pisanju zaključka usporediti K_m i V_m vrijednosti dobivene vježbom sa vrijednostima pronađenim tijekom pretraživanja enzimske baze podataka BRENDA u vježbi 7.*

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

Organizacija eukariotske DNA u više stukture

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je molekula nasljeđa (molekula života) našeg i svih živih organizama, a njena osnovna funkcija je pohrana i prijenos genetske informacije. Naime, svaka molekula DNA sadrži potpuni set instrukcija neophodnih za upravljanje stanicom, kao i set instrukcija za formiranje nove stanice, odnosno novog organizma, koji se u toj molekuli nalazi zapisan u obliku slijeda nukleotida. Takav jedan set instrukcija za formiranje novog organizma, kao i upravljanje stanicom u svoj njegovoj složenosti očito mora biti poprilično velik. Da je to tako pokazuju istraživanja genoma brojnih organizama, tako i ljudi.

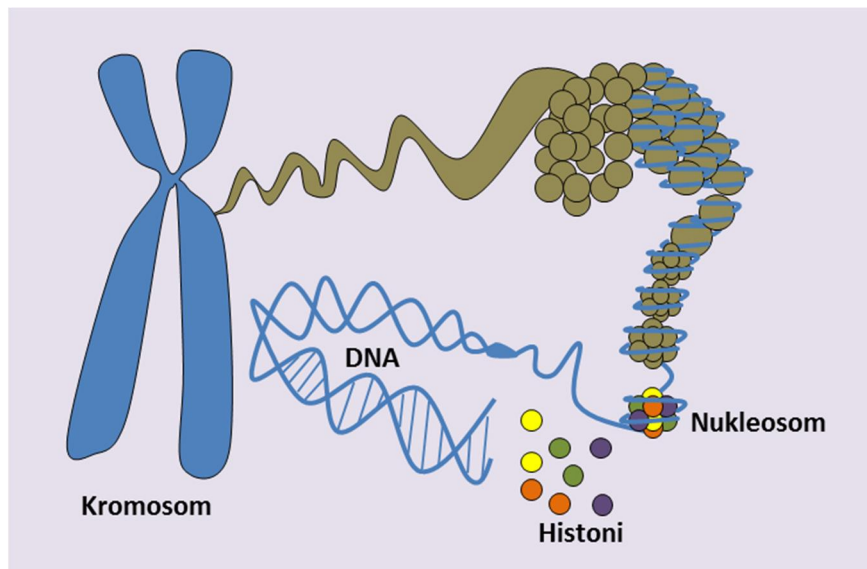
Istraživanja ljudskog genoma pokazala su da gotovo svaka ljudska stanica sadrži DNA molekulu sastavljenu od 3 milijarde parova baza (3×10^9 bp). Uz poznavanje osnovnih strukturnih karakteristika molekule DNA, odnosno znanje da je molekula DNA dvostruka uzvojnica sastavljena od dva deoksiribonukleotidna lanca međusobno obmotana oko zajedničke osi u spiralnu strukturu, te znanje da jedan puni zavoj u spiralnoj molekuli DNA iznosi 3,4 nm, a čini ga 10 bp, vrlo lako možemo izračunati dužinu DNA molekule. Naime, ako 10 bp čini jedan puni zavoj u DNA, a dužina punog zavoja iznosi 3,4 nm, tada možemo reći da jedan par baza (1 bp) ima dužinu od 0,34 nm. Obzirom da znamo broj parova baza u ljudskoj DNA, tada vrlo lako možemo izračunati dužinu molekule DNA u stanici:

$$3 \times 10^9 \text{ bp} \times 0,34 \text{ nm/bp} = 1\,020\,000\,000 \text{ nm} = 1\,020\,000 \mu\text{m} = 1\,020 \text{ mm} = 1,02 \text{ m}$$

Znači, svaka ljudska stanica sadrži DNA molekulu dužine 1,02 m. I sad se postavlja očigledno pitanje, kako to molekula DNA dužine 1,02 m može stati u ljudsku stanicu čija je prosječna veličina, odnosno dužina svega 100 μm , što zapravo predstavlja 1/5 promjera mine za tehničku olovku?

Štoviše, situacija se dodatno komplicira našim znanjem da je DNA molekula smještena u jezgri koja čini oko 1/5 čitave stanice, što znači da još manje prostora stoji na raspolaganju za smještanje 1 m DNA.

Odgovor leži u organizaciji DNA u više strukture (**Slika 18**). Naime, DNA molekula se obmata oko malih bazičnih proteina histona u organiziraniju strukturu zvanu nukleosom, a potom se nukleosomi dodatno omataju jedni oko drugih tvoreći složenije strukture koje se još dodatno umataju i na takav način se DNA molekula dužine jednog metra spakuje u vrlo mali prostor jezgre.



Slika 18. Organizacija DNA u više strukture

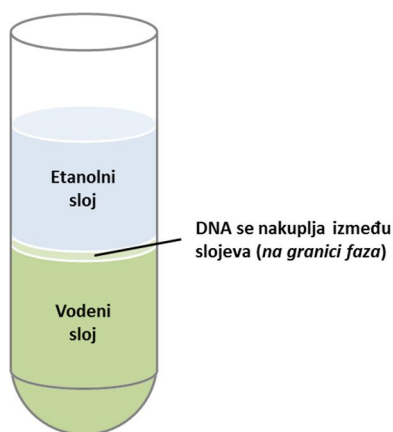
Obzirom da ovaj proces umatanja, odnosno organiziranja DNA molekule u složene strukture ne možemo vidjeti golim okom, u vježbi 11 ćemo se poslužiti obrnutim procesom. Razmotat ćemo DNA molekule iz stanica na pahuljičastu tvorevinu tankih i dugih niti koje ćemo moći vidjeti u epruveti. Pri tome ćemo kao izvor iz kojeg ćemo izolirati DNA molekule koristiti kivi.

Vježba 11. Izolacija DNA iz kivija

Svrha vježbe: Upoznati se sa načinom izolacije DNA iz biološkog uzorka, te načinom provjere čistoće izolirane DNA.

Da bismo molekule DNA kivija mogli vidjeti kao tanke paučinaste niti, DNA ćemo morati izolirati iz stanica kivija, a to ćemo postići kroz nekoliko koraka. Prvo ćemo razbiti stanice kivija djelovanjem mehaničke sile (štapni mikser), a potom ćemo DNA molekule osloboditi iz stanične jezgre primjenom pufera za ekstrakciju DNA. Naime, pufer za ekstrakciju DNA sadrži anionski deterdžent natrij-dodecil sulfat koji će otopiti membrane jezgre i na takav način omogućiti oslobađanje DNA molekule, a ioni natrijeva klorida prisutni u puferu omogućiti će odvajanje DNA molekule od histona i njenu stabilizaciju u vodenoj otopini. Sve to biti će pospješeno povišenom temperaturom ekstrakcije (45°C), koja će i pogodovati djelovanju proteolitičkih enzima kivija koji će djelomično razgrađivati histone i druge proteine kivija te na takav način omogućiti lakše odvajanje molekula DNA od ostalih staničnih sastojaka u narednim koracima izolacije.

Za odvajanje oslobođenih DNA molekula od ostalih staničnih sastojaka u ekstraktu, pomiješat ćemo dio dobivenog ekstrakta sa etanolom, pri čemu će se molekule DNA u obliku pahuljičaste tvorevine dugih i tankih niti koncentrirati na granici faza između donjeg vodenog i gornjeg etanolnog sloja (**Slika 19**). Glavni razlog koncentriranja DNA molekula na granici faza su jake elektrostatske odbijajuće interakcije između negativno nabijenih DNA molekula i negativno nabijenih molekula natrijeva dodecil sulfata, koje zapravo guraju molekule DNA iz vodenog sloja ka granici faza.



Slika 19. Razdjeljivanje molekula DNA na granici faza između donjeg vodenog i gornjeg etanolnog sloja

Daljnje pročišćavanje DNA molekula provest će se kroz nekoliko koraka otapanja i taloženja, a sve u svrhu dodatnog uklanjanja eventualno zaostalih proteina. Na kraju ćemo čistoću pročišćene DNA odrediti mjerenjem odnosa apsorbancije otopine DNA pri 260 i 280 nm. Naime što je vrijednost omjera apsorbancije pri 260 i 280 nm veća, to je DNA pročišćenija, a kada taj omjer iznosi više od 2, možemo smatrati da smo vrlo dobro pročistili DNA.

Zadatak vježbe: Izolirati DNA iz kivija te odrediti čistoću izolirane DNA.

Reagensi

Kivi

Fiziološka otopina (0,9 % otopina NaCl)

Pufer za ekstrakciju DNA (100 mM Tris-HCl pufer, pH 8,8, koji sadrži 150 mM NaCl i 1 % natrij-dodecil sulfat)

95 % etanol

70 % etanol

Pufer za otapanje DNA (0,34 M natrijev citrat pH 7,4, koji sadrži 3 M NaCl)

Pribor

Štapni mikser

Menzura 25, 50 i 200 mL

Staklena čaša 400 mL

Kivete za centrifugiranje 50 mL

Vodena kupelj

Stakleni lijevak

Nabrani filter papir

Centrifuga

Kapalica

Vortex mješalica

Mikropipeta 100 i 1000 μ L

UV-kivete

Spektrofotometar

Postupak

Kivi oguliti i narezati na tanke ploške, a ploške na kockice te prenijeti u staklenu čašu i pomiješati sa 20 mL fiziološke otopine. Suspenziju homogenizirati 30 s štapnim mikserom pri čemu se djelovanjem mehaničke sile stanice kivija razbijaju.

Homogeniziranoj suspenziji potom dodati 130 mL pufera za ekstrakciju DNA, smjesu promiješati te prenijeti u kivete za centrifugiranje od 50 mL.

Kivete potom postaviti u vodenu kupelj zagrijanu na 45 °C i inkubirati 30 minuta tijekom kojih se molekule DNA oslobađaju iz stanične jezgre djelovanjem natrijeva dodecil sulfata, a histoni odvajaju od molekula DNA zbog djelovanja natrijeva klorida i djelomične razgradnje histona proteolitičkim enzimima kivija.

Po isteku vremena inkubacije smjesu preko nabranog filter papira profiltrirati u menzuru. Filtrat prenijeti u čiste kivete za centrifugiranje te izbistriti centrifugiranjem 5 minuta pri 3900 o/min. Bistri ekstrakt odvojiti od taloga dekantiranjem.

20 mL bistrog ekstrakta prenijeti u kivetu za centrifugiranje i nadliti sa 20 mL hladnog 95 %-tnog etanola polaganim lijevanjem uz stjenku kivete. Smjesu inkubirati 5 minuta pri -20 °C tijekom kojih se DNA molekule izdvajaju na granici faza. Po isteku vremena gornji etanolni sloj odvaditi kapalicom i odbaciti, i potom molekule DNA kapalicom prenijeti u čiste kivete za centrifugiranje.

DNA molekulama u kiveti dodati 10 mL pufera za otapanje DNA i 10 mL ledeno hladnog 95 %-tnog etanola, smjesu blago promiješati inverzijom kivete, i potom inkubirati pri -20 °C tijekom 5 minuta u svrhu taloženja DNA. Po isteku vremena DNA molekule odvojiti od supernatanta centrifugiranjem pri 3900 o/min tijekom 5 minuta, a potom odbaciti supernatant dekantiranjem.

Talogu DNA molekula dodati 20 mL 70 %-tnog etanola i smjesu promiješati na vortex mješalici 30 s. Suspenziju izbistriti centrifugiranjem 5 minuta pri 3900 o/min, a supernatant odbaciti dekantiranjem.

Talog molekula DNA prosušiti otparavanjem etanola u sušioniku pri 55°C tijekom 5 minuta. Prosušenom talogu molekula DNA potom dodati 10 mL destilirane vode i 50 µL pufera za otapanje DNA, te DNA molekule otopiti miješanjem na vortex mješalici, i ovu otopinu koristiti za mjerenje apsorbancije pri 260 i 280 nm.

U UV kivetu otpipetirati 250 µL otopine DNA i 750 µL destilirane vode, promućkati inverzijom te izmjeriti apsorbancije otopine pri 260 i 280 nm uz baždarenje spektrofotometra destiliranom vodom.

REZULTATI MJERENJA

Vrijednosti izmjerene apsorbancije otopine DNA

Uzorak	$\Delta A_{260\text{nm}}$	$\Delta A_{280\text{nm}}$	$\Delta A_{260\text{nm}}/\Delta A_{280\text{nm}}$
Paralela 1			
Paralela 2			
Paralela 3			
Srednja vrijednost			

Zaključak	
-----------	--

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--

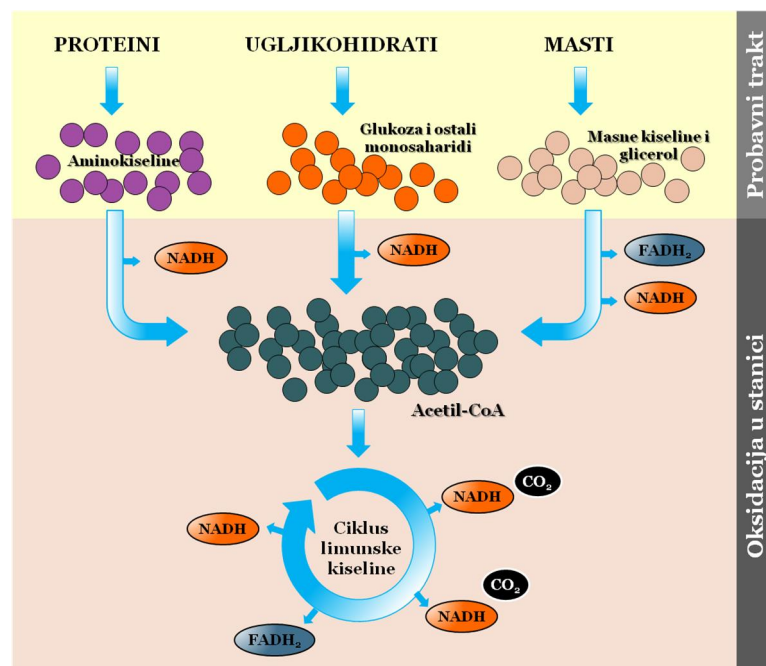
Uvod u metabolizam – probava hrane

Osnovne biološke funkcije našeg i svih ostalih živih organizama su rast, razvoj i razmnožavanje (davanje potomstva), te da bi to mogao provesti naš organizam treba energiju i molekule za izgradnju vlastitih složenih molekula.

Postavlja se pitanje odakle to našem organizmu energija i molekule za izgradnju vlastitih složenih molekula?

Naš se organizam snabdijeva energijom i potrebitim molekulama putem hrane koju pojedemo, i to tako da složene molekule hrane razgradi na jednostavne molekule, a potom te jednostavne molekule koristi za izgradnju vlastitih složenih molekula ili ih potpuno oksidira do CO_2 . Tijekom oksidacije molekula hrane, energiju sadržanu u kemijskim vezama molekula hrane naš organizam skuplja u reduciranim koenzimima (NADH i FADH_2) i potom koristi za dobivanje energije neophodne za održavanje organizma u obliku ATP-a.

Razgradnja molekula hrane započinje u probavnom traktu gdje se složene molekule hrane razgrađuju na jednostavne molekule, koje se potom apsorbiraju i krvlju prenose do stanica u našem organizmu, a u stanicama se te jednostavne molekule koriste za izgradnju složenih molekula stanice ili za dobivanje energije u obliku ATP-a (**Slika 20**).



Slika 20. Oksidacija molekula hrane

Kako se to hrana razgrađuje u probavnom traktu? Molekule hrane razgrađuju se djelovanjem enzima koji se nalaze u probavnim sokovima. Tako u ustima započinje razgradnja škroba djelovanjem enzima amilaze prisutne u slini, dok se u želucu molekule hrane denaturiraju djelovanjem kloridne kiseline u sastavu želučanih sokova, a proteini hrane djelomično razgrađuju uslijed djelovanja enzima pepsina. Glavnina razgradnje molekula hrane dešava se u tankom crijevu gdje se djelomično razgrađene molekule škroba razgrađuju do glukoze, složeni oligosaharidi na monosaharide, a djelomično razgrađene molekule proteina razgrađuju do di- i tri-peptida ili do aminokiselina djelovanjem probavnih sokova gušterače koji sadrže enzime za njihovu razgradnju. Osim navedenih u tankom se crijevu masti razgrađuju na monoacilglicerole i masne kiseline djelovanjem lipaza iz probavnih sokova gušterače, a nukleinske kiseline na nukleotide djelovanjem nukleaza.

Nakon što su molekule hrane razgrađene na jednostavne molekule (dipeptidi, tripeptidi, aminokiseline, glukoza i drugi jednostavni monosaharidi, monoacilgliceroli i masne kiseline, nukleotidi) u tankom crijevu se apsorbiraju i krvlju transportiraju do stanica unutar organizma.

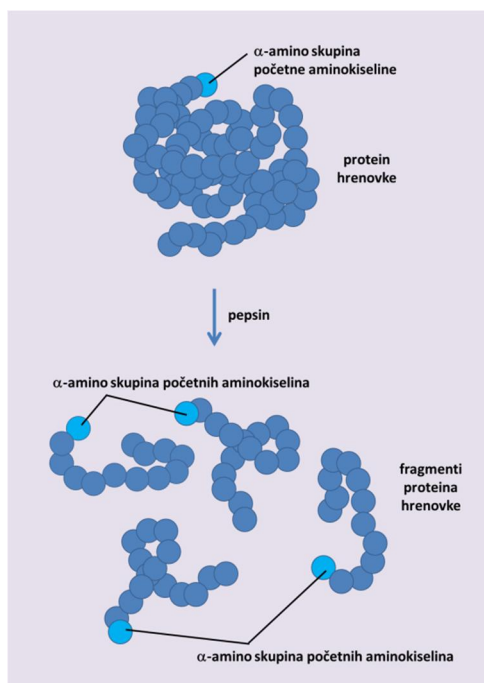
Kako bismo pospješili naše znanje o probavi u vježbi 12 ćemo simulirati probavu proteina u želucu tako što ćemo hrenovku pomiješati sa otopinom kloridne kiseline i enzimom pepsinom i potom tijekom 100 minuta pratiti povećanje količine slobodnih amino skupina nastalih kao rezultat djelomične razgradnje proteina enzimom pepsinom.

Vježba 12. Simulacija probave proteina u želucu

Svrha vježbe: Upoznati se sa razgradnjom proteina u želucu djelovanjem pepsina.

Pepsin je enzim probavnog trakta, kojeg u želudac luče stanice stijenke želuca u obliku inaktivnog preteče – pepsinogena, a koji potom u želucu pod utjecajem niskog pH (1,2-3) želučanog soka prelazi u aktivni oblik (pepsin). Ovaj enzim cijepa peptidnu vezu unutar polipeptidnog lanca pri čemu se proteini razgrađuju na manje fragmente.

Cijepanje peptidne veze i nastanak manjih fragmenata proteina rezultira povećanjem broja slobodnih amino skupina u smjesi, budući svaki fragment proteina nastao cijepanjem peptidne veze sadrži novu slobodnu α -amino skupinu (**Slika 21**).



Slika 21. Povećanje broja slobodnih amino skupina nastalo zbog razgradnje proteina na manje fragmente djelovanjem pepsina

Upravo ovo povećanje broja slobodnih amino skupina koje ćemo odrediti OPA reagensom biti će nam pokazatelj razgradnje proteina hrenovke.

Zadatak vježbe: U nizu epruveta provesti simulaciju probave proteina koja se dešava u želucu.

Reagensi

Hrenovka

100 mM HCl koja sadrži 15 mM NaCl

Otopina pepsina - pepsin otopljen u 0,05 M HCl pH = 1,5, $\gamma(\text{pepsina}) = 10 \text{ mg/mL}$

10 % otopina trikloroctene kiseline

Otopina natrijeva tetraborata ($c = 0,1 \text{ M}$; pH = 11)

OPA reagens (*sastav reagensa vidjeti u vježbi 5*)

Pribor

Staklena čaša 400 mL
Štapni mikser
Menzura 100 mL
Klipne pipete 1 i 10 mL
Kivete za centrifugiranje 10 mL
Vodena kupelj
Stakleni lijevak
Nabrani filter papir
Centrifuga
Kapalica
Vortex mješalica
Mikropipeta 100 i 1000 µL
PMMA-kivete
Spektrofotometar

Postupak

Hrenovku kuhati 5 minuta u kipućoj vodi, potom izrezati na ploške, prenijeti u staklenu čašu i pomiješati sa 60 mL 100 mM HCl pH 1 koja sadrži 15 mM NaCl. Suspenziju homogenizirati 30 s štapnim mikserom.

U kivetama za centrifugiranje (10 mL) pripremiti reakcijske smjese za glavne probe i reakcijsku smjesu u nultoj minuti prema dolje prikazanoj tablici i potom glavne probe inkubirati u vodenoj kupelji određeno vrijeme pri 37 °C:

Otopine	RSNM (mL)	GP ₁ (mL)	GP ₂ (mL)	GP ₃ (mL)	GP ₄ (mL)	GP ₅ (mL)
Suspenzija hrenovke u 100 mM HCl sa 15 mM NaCl	4	4	4	4	4	4
10 % trikloroctena kiselina	2	-	-	-	-	-
Otopina pepsina ($\gamma = 10$ mg/mL)	1	1	1	1	1	1
Vrijeme inkubacije/min	0	20	40	60	80	100
10 % trikloroctena kiselina	-	2	2	2	2	2

Po isteku inkubacije u glavnim probama prekinuti enzimsku reakciju dodatkom 10 % trikloroctene kiseline. Reakcijsku smjesu u nultoj minuti i glavne probe izbistriti centrifugiranjem (5000 o/min, 10 min, 25°C). Bistri ekstrakt odvojiti od taloga dekantiranjem i filtriranjem kroz nabrani filter papir u staklenu epruvetu, te koristiti za određivanje količine slobodnih amino skupina.

Prije određivanja slobodnih amino skupina potrebno je pripremiti željeno razrijeđenje uzorka (bistrog ekstrakta) u 0,1 M otopini natrijeva tetraborata prema sljedećoj tablici:

Otopine	RSNM (mL)	GP ₁₋₅ (mL)
Bistri ekstrakt	1	1
0,1 M natrijev tetraborat	5	5

Tako razrijeđene ekstrakte potom koristiti za određivanje slobodnih amino skupina. U kivete otpipetirati otopine redoslijedom prikazanim u donjoj tablici. Kivetu prekriti parafilmom, promućkati inverzijom, te nakon 2 minute izmjeriti apsorbanciju pri 340 nm.

Otopine	SP* (μL)	RSNM (μL)	GP ₁₋₅ (μL)
0,1 M natrijev tetraborat	50	-	-
Razrijeđeni bistri ekstrakt	-	50	50
OPA reagens**	1000	1000	1000

Promiješati inverzijom i nakon 2 minute inkubacije na sobnoj temperaturi izmjeriti apsorbanciju otopine pri 340 nm

* SP – slijepa proba – služi za „zeroiranje“ spektrofotometra

** OPA reagens je potrebno dodati uz razmak od 15 s između kiveta

Iz dobivenih podataka izračunati razliku apsorbancije između glavnih proba i reakcijske smjese u nultoj minuti prema sljedećoj formuli:

$$\Delta A_{340\text{nm}} = A_{340\text{nm}}(\text{GP}) - A_{340\text{nm}}(\text{RSNM})$$

te izraziti količinu oslobođenih amino skupina prema sljedećoj formuli:

$$\text{Količina slobodnih amino skupina (nmol)} = \Delta A_{340\text{nm}} \times 6 \times 2,437$$

gdje je:

6 – faktor razrijeđenja uzorka

2,437 – faktor za izračun količine slobodnih amino skupina

REZULTATI MJERENJA

Izmjerene vrijednosti apsorbancije

Uzorak	$A_{340\text{nm}}$	$\Delta A_{340\text{nm}}$
RSNM		-
GP ₁		
GP ₂		
GP ₃		
GP ₄		
GP ₅		

Izračun količine slobodnih amino skupina

--	--

Količina slobodnih amino skupina

Uzorak	t/min	nmol
GP ₁	20	
GP ₂	40	
GP ₃	60	
GP ₄	80	
GP ₅	100	

Grafički prikaz razgradnje proteina tijekom vremena

--

Zaključak	
------------------	--

Pregledano		Potpis nastavnika	
------------	--	-------------------	--