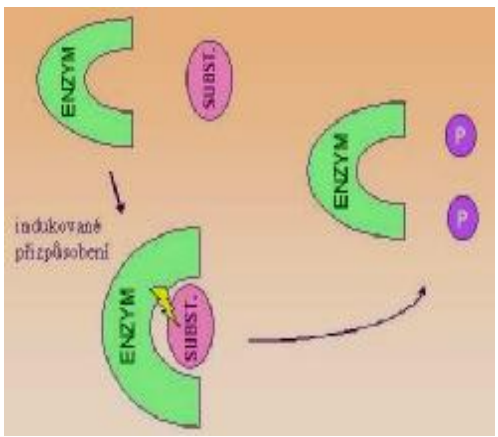
STANOVENÍ AKTIVITY b-GLUKOSIDÁZY

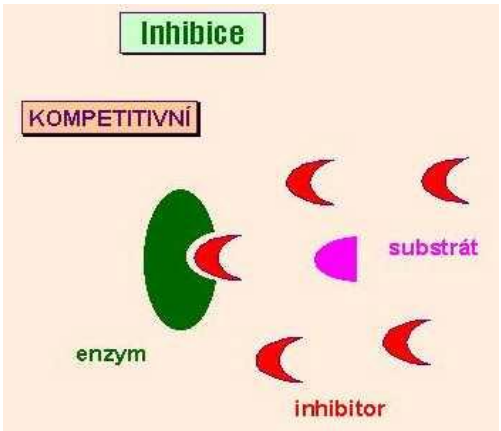
ENZYMY A ENZYMOVÁ KATALÝZA

Enzymy (starším názvem fermenty) jsou globulární proteiny, které katalyzují (bio)chemické reakce v živých soustavách (obr. č.1) a určují jejich směr a specifičnost. Mají molekulovou hmotnost 10^4 - 10^5 (tj. tvoří je 100 - 1000 aminokyselin). Látky, které se účinkem enzymů mění označujeme jako **substráty**. Rozlišujeme enzymy jednoduché (čistá, katalyticky aktivní bílkovina) a složené (holoenzmy). Holoenzymy jsou tvořeny **apoenzymem** (vlastní bílkovina) a **koenzymem** (nebílkovinná složka). Koenzymy jsou buď kofaktory (např. některé kationty kovů), které jsou vázány k apoenzymu volnou vazbou (disociabilní), nebo prostetické skupiny (např. vitamíny - pyridoxin, biotin, flaviny…), které jsou vázány kovalentní vazbou. Katalytické místo na enzymu se nazývá aktivní centrum, zatímco tzv. aktivní místo enzymu je vazebné místo pro substrát (eventuelně inhibitor).

K základním rysům enzymové katalýzy náleží velká **reakční rychlost** a specifita. **Specifita** je buď **účinková**, tzn. že se vztahuje k typu katalyzované rce - např. oxidací vzniká oxokyselina, transaminací vzniká oxo + aminokyselina atd., nebo substrátová. **Substrátová specifita** se vztahuje k substrátu a může být absolutní (např. ureáza štěpí jen močovinu), skupinová - enzym štěpí substráty nesoucí určitou funkční skupinu (např. alkoholy nebo estery), nebo relativní (přeměňují více skupin, např. alkoholy i estery).



Obr. č. 1 Schéma enzymové katalýzy



Obr. č. 2 Schéma kompetice substrátu a inhibitoru o vazebné místo

KLASIFIKACE ENZYMŮ

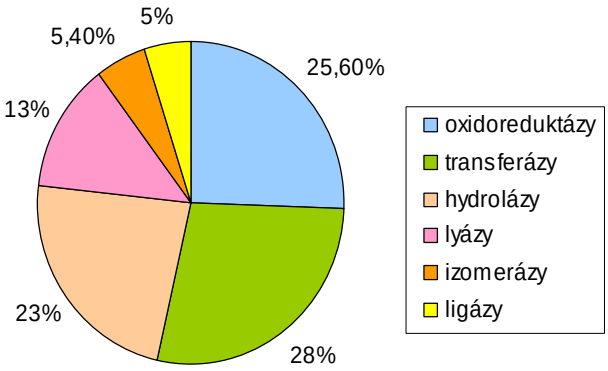
Nomenklatura a klasifikace enzymů dnes čítá přes 2 500 enzymů. Každý enzym má své katalogové čtyřmístné číslo (uvádí se v odborných pracech) zahrnující racionální

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

název a typ katalyzované rce. Názvy typu α-amyláza, trypsin, polyfenoloxidáza jsou triviální. Katalogové čtyřmístné označení např. EC 3.1.2.5 pak znamená:

EC - enzymový kód (Enzyme Commision)
3 - enzymová třída
1- podtřída (esterázy, glukosidázy, proteinázy…..)
2 - typ kofaktoru
5 - označuje konkrétní enzym

Relativní podíl enzymů (enzymových tříd) v živých soustavách



V systematice enzymů se nerozlišují mnohočetné formy enzymů tzv. izoenzymy. Izoenzymy jsou molekulárně shodné, ale strukturně odlišné enzymy, liší se jen elektroforetickou pohyblivostí. Mají stejnou substrátovou i účinkovou specifitu.

VLASTNOSTI A LOKALIZACE ENZYMŮ V ROSTLINÁCH

Vesměs jsou rostlinné enzymy termolabilní molekuly, v buňkách přítomné jako rozpustné (např. v matrix mitochondrií nebo ve vakuolách, některé enzymy glykolýzy), multienzymové komplexy - agregáty více enzymů (v cytoplazmě) nebo membránově vázané (např. adenosintrifosfatáza, enzymy dýchacího řetězce). Výskyt enzymů je závislý na jejich funkci a proto nemusí být jejich distribuce v rostlinách rovnoměrná. Např. aminooxidáza je v šestidenních klíčních rostlinách hrachu zastoupena z 90 % v dělohách, 7 % ve vrcholu a cca 1 % v kořenech. Účinek enzymů (tj. ovlivnění kinetiky reakce) je regulován pH a teplotou prostředí. Řada enzymů se chová allostericky, tj. ovlivňuje ho ještě přítomnost nízkomolekulárního efektoru. Výsledek enzymatické reakce je dále závislý na množství enzymu a substrátu.

EXTRAKCE ENZYMŮ

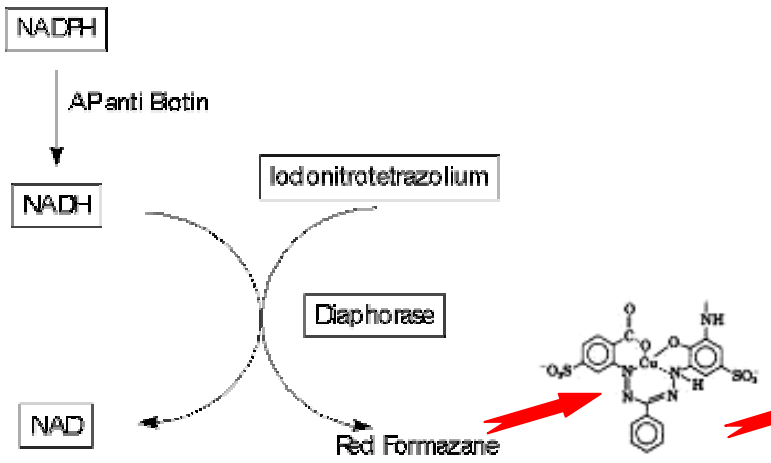
Izolace enzymů je poměrně náročná laboratorní záležitost vzhledem k jejich nestabilitě a přítomnosti jiných látek v extraktech. Extrakce se provádí po homogenizaci v tekutém dusíku do pufrů s obsahem stabilizačních činidel (inhibitory proteináz, dithiotreitol - přítomnost ochraných -SH skupin, látky ochraňující aktivní centrum…). Následují purifikační kroky - mohou zahrnovat různě centrifugaci, vysolování síranem amonným, dialýzu, chromatografickou separaci, různé srážecí

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

metody aj. Takto získané preparáty se pak ještě přečišťují ultracentrifugací, elektroforeticky či chemickými metodami. Vyjma enzymů s kvartérní strukturou (enzymy z více subjednotek) je možné preparáty lyofilizovat pro uchovávání. Řada rostlinných enzymů se může uchovávat v 50% glycerolu při -20 ^{O}C.

METODY STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY

Pro stanovení enzymové aktivity je používána ředa metod **spektrofotometrických**, **fluorescenčních, polarimetrických, radiometrických**, **elektrodových a speciálních**. Často se nejprve vychází z orientačních stanovení, která jsou lehce proveditelná a finančně nenáročná. Teprve potom se přistupuje k detailní kvantifikaci. Mezi klasické orientační metody pomocí nichž se např. určuje životnost semen patří použití tzv. tetrazoliových solí (TTC-trifenyltetrazoliumchlorid), které jsou bezbarvé. Oxidoreduktázy, které jsou funkční jen v živých buňkách (obr. č. 3) a pletivech (semenech) je redukují na intenzivně zbarvené formazany (obr. č. 4), zatímco mrtvé buňky a pletiva se nebarví. Redukce TTC je irreverzibilní a téměř neovlivnitelná kyslíkem.



Obr. č. 3 Účinek diaforázy a vznik červeného formazanu



Obr. č. 4 Embryo obilky obarvené TTC na formazan

STANOVENÍ AKTIVITY b-GLUKOSIDÁZY spektrofotometricky

Pod pojmem **b-glukosidáza** rozumíme hydrolytický(é) enzym(y) [EC 3.2.1.21] o molekulové hmotnosti kolem 135 000 štěpící O-glukosidy, resp. některé jiné glukosidy organických látek. Enzymy tohoto typu s různou substrátovou specifitou se vyskytují nejen v rostlinných pletivech (např. štěpení amygdalinu), ale také v bakteriích, kvasinkách apod. V rostlinách se vyskytují specifické a nespecifické β-glukosidázy. Enzym je významný pro štěpení oligosacharidů a může mít endo- i exo- hydrolázovou aktivitu. Stanovení jeho aktivity se zabývají ve sladařství, v pivovarnictví. V

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

laboratorních podmínách lze pomocí čistého enzymu štěpit některé jednoduché glukosidy na glukózu a aglykon.

Praktické provedení stanovení aktivity b-glukosidázy

se substrátem PNPG - *para*-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid

1. Vlastní postup

1. odběr a homogenizace materiálu (zmražení kapalným dusíkem, rozdrcení na prášek, nesmí se rozmrazit !!!)
2. homogenát smíchat s extrakčním pufrem EB (na 0,2 g vzorku 400 µl extrakčního pufru) a udržovat v nádobě s ledem
3. krátce promíchat (vortex)
4. centrifugace 15 - 20 minut při 4 ^{o}C a 13 000 g
5. odebrat 20 µl supernatantu, přidat 280 µl citrátového pufru CB + 100 µl PNPG 20 mM
6. inkubace při 30 ^{o}C po dobu 60 (někdy až 120) minut, zapnout spektrofotometr, nahřát lampu 20 min
7. zastavení reakce 2 M Na_2CO_3 - 600 µl
8. měření absorbance na spektrofotometru při 405 nm
9. stanovení obsahu hrubých bílkovin dle Bradfordové při 595 nm
10. přepočet aktivity β-glukosidázy na proteiny (U/mg proteinu)

2. Příprava pufrů

extrakční pufr (EB) 100 ml

Tris-HCl (pH 7,5) ……..	0,3025 g	pH 7,5 (doplnit PMSF + PIC)
5 mM $MgCl_2 . 6H_2O$ ……..	0,1016 g	
1 mM EDTA ……..	0,0372 g	

Extrakční pufr obsahuje látky stabilizující enzymy (proteiny) a dále inhibitory proteáz. PMSF je fenylmetylsulfonylfluorid (!toxický!) (1 mM PMSF) - rozpustný v izopropanolu nebo DMSO (dimetylsulfoxid). PIC je protease inhibitor coctail koncentrát je uložen v mrazničce při - 20 ^{o}C, pro přípravu EB odebrat 1µl.

citrátový pufr (CB)

50 ml kyselina citronová ……..	0,9605 g	pH 5,6
50 ml $Na_2HPO_4 . 12 H_2O$ …….. ……	3,58 g	

Citrátový pufr je reakční pufr.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

3. Určení specifické aktivity b-glukosidázy

enzym (SIGMA) - 2 500 U (880 mg), specifická aktivita 2,84 U/mg

definice **1 U** : 1 µM S ⟶ 1 µM P / min při 30 ^{O}C,

Kalibrační křivka (β-glukosidáza) vychází z různé specifické aktivity enzymu:

2,84 U/mg ⟶ 1 ml extrakčního pufru s inhibitorem proteáz:

a z toho odběr a naředění do 1 ml :

dávka do 1 ml EB	specifická aktivita 4 ml standardu
35 µl	**397,6** mU
30 µl	**340,8** mU
25 µl	**284** mU
20 µl	**227** mU
15 µl	**170** mU
10 µl	**113,5** mU
5 µl	**56,6** mU
1 µl	**11,36** mU

4. Potřeba chemikálií (předpoklad - hmotnost vzorku 0,2 g)

chemikálie	počet vzorků	30	35	40	45	50	55
Extrakční pufr	Tris	300 µl	350 µl	400 µl	450 µl	500 µl	550 µl
	$MgCl_2$	60 µl	70 µl	80 µl	90 µl	100 µl	110 µl
	EDTA	24 µl	28 µl	32 µl	36 µl	40 µl	44 µl
	PMSF	120 µl	140 µl	160 µl	180 µl	200 µl	220 µl
	Protease.inhib. coctail	12 µl	14 µl	16 µl	18 µl	20 µl	22 µl
	celkový objem	**12 ml**	**14 ml**	**16 ml**	**18 ml**	**20 ml**	**22 ml**
citrátový pufr		8,4 ml	9,8 ml	11,2 ml	12,6 ml	14 ml	15,4 ml
PNPG		3 ml	3,5 ml	4 ml	4,5 ml	5 ml	5,5 ml
Na_2CO_3		18 ml	21 ml	24 ml	27 ml	30 ml	33 ml

5. Pipetování (pomocí digitálních pipet a speciálních dávkovačů)

400 m**l EB** - stříkačka 5 ml - pozice 4 (400 µl)
280 m**l CB** - stříkačka 12,5 ml - pozice 1 (250 µl) + Biocontrol - pozice 6 x 30 (1dávka - 30µl)
100 m**l PNPG** - stříkačka 5 ml - pozice 1 (100 µl)
600 m**l Na_2CO_3** - stříkačka 5 ml - pozice 3 [2 x (1 dávka - 300 µl) …600 µl]

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

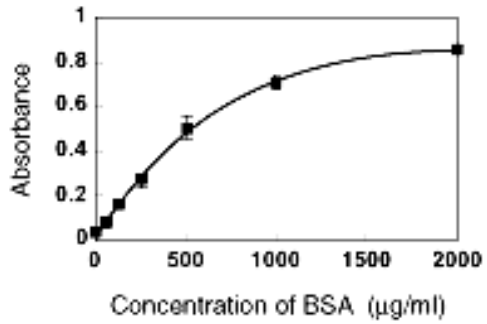
6. Stanovení obsahu bílkovin dle Bradfordové

Princip metody spočívá ve stanovení obsahu nespecifických bílkovin obarvených Coomassiho briliantovou modří odečtením z kalibrační křivky vytvořené měřením hodnot známého množství bílkoviny, většinou BSA (bovine serum albumin – hovězí sérový albumin BSA v koncentraci 0,5 mg BSA/ml rozpouštědla) rovněž obarvených Coomassiho briliantovou modří.

Pro měření se používá 2 – 5 µl vzorku ze supernantantu z kroku č. 5. Po přídavku 1 ml barvičky a cca 2 minutách ustavení rovnováhy ve vzorku měřit absorbanci při 595 nm.

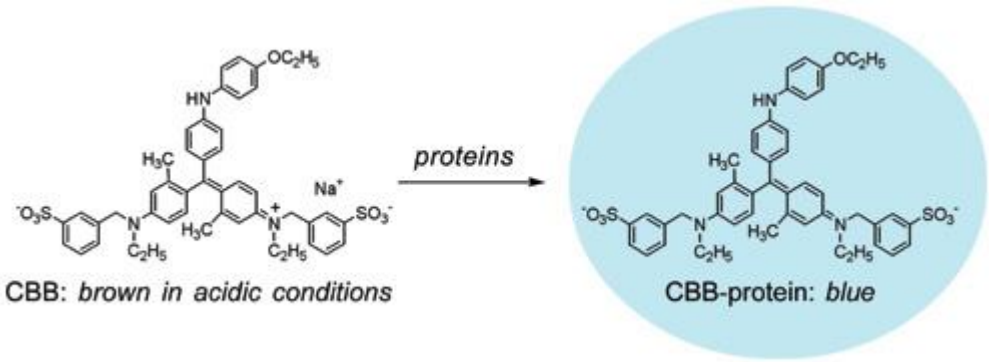
Kalibrační křivka (BSA) – příprava standardů (v destilované vodě)

koncentrace	absorbance
0,032	-0,042
0,063	0,184
0,125	0,269
0,25	0,298
0,5	0,464
0,75	0,535
1	0,629
2	0,807



BSA standard solution

Princip barevné reakce:



! Měří se v plastových kyvetách. Kyvety je nutno po měření vypláchnout (odbarvit) vlažným 20% metanolem ve vodě (silnější metanol kyvety leptá). Po té se kyvety opláchnou ve vodě a destilované vodě, dosuší v sušárně.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Zpracování výsledků a vypracování protokolu

Bude provedena amnalýza aktivity b-glukosidázy ve vzorcích embryí, endospermu a obilek ječmene z úlohy č. 22 (Stanovení rychlosti klíčení obilek ječmene). V průběhu hodnocení úlohy č. 22 budou provedeny odběry materiálu (cca 0,2 g) a vzorky budou zamraženy.

S ohledem na předpokládané rozdíly v aktivitě tohoto enzymu při klíčení obilek a izolovaných embryí byly vzorky odebrány následovně pro obě odrůdy (s hlubší i slabší dormancí):

		Respekt	Philadelphia
zbobtnalý materiál	E	č.1	č.15
	Ob	č.2	č.16
24 hod	E - nekl.	č.3	č.17
	Ob - nekl.	č.4	č.18
	E - vykl.	č.5	č.19
	Ob - vykl.	č.6	č.20
48 hod	E - nekl.	č.7	č.21
	Ob - nekl.	č.8	č.22
	E - vykl.	č.9	č.23
	Ob - vykl.	č.10	č.24
72 hod	E - nekl.	č.11	č.25
	Ob - nekl.	č.12	č.26
	E - vykl.	č.13	č.27
	Ob - vykl.	č.14	č.28

legenda k tabulce:

E – embryo, Ob – obilka, nekl. – nevyklíčené, vykl. – vyklíčené

č. 1 až č. 28 – čísla vzorků

V protokolu budou uvedena data měření (absorbance pro β-glukosidázu i proteiny). Výsledky budou přepočteny na hodnoty specifické aktivity β-glukosidázy (U/mg proteinu), zprůměrovány a budou vypočteny střední chyby (opakování měření – pouze β-glukosidáza). Celá skupina vypracuje jediný protokol, budou popsány jednotlivé vzorky.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz