

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Izolace enzymů

### 1.1.1 Úprava biologického materiálu

K biochemickým studiím se používá nejrůznější biologický materiál, který příroda poskytuje. Vzhledem k jeho různorodosti je technika jeho zpracování mnohdy velmi odlišná a řídí se účelem, k jakým studiím jej má být použito. Způsob zpracování těchto materiálů bývá často odlišný podle toho, zda mají být výchozí surovinou pro izolaci, stanovení nějaké sloučeniny či skupiny látek nebo zda chceme studovat jejich metabolismus.

Má-li být izolována nějaká látka, nebo skupina látek z biologického materiálu (např. určitý vitamín, bílkovina, sacharid apod.) je důležité zvolit vhodnou výchozí surovinu. Pro izolaci se hodí nejlépe takový biologický materiál, v němž je požadovaná látka v nejvyšší koncentraci, je dostupný a jeho cena je přijatelná. Vybraný živočišný, rostlinný nebo mikrobiální materiál je třeba důkladně rozrušit, aby pak mohla být izolovaná látka následně extrahována. Rozrušení výchozího materiálu se provádí nejčastěji mletím (na sucho) nebo homogenizací.

#### **Homogenizace**

V biochemické praxi je homogenizace chápána jako důkladné rozmělnění materiálu za přídavku vody nebo vhodných roztoků, nejčastěji různých pufrů nebo fyziologických roztoků. Homogenizace je prováděna v nejrůznějších komerčních homogenizátorech, ale i ve výkonném mixeru. Další způsob homogenizace je roztírání materiálu v třecí misce za přídavku písku nebo jiného abraziva. K materiálu lze také přidat kapalný dusík a zmražený materiál tak snadněji rozdrtit.

### 1.1.2 Extrakce

Při izolaci proteinů nebo jiných biologických makromolekul je třeba tyto látky převést z homogenizovaného materiálu do roztoku. Způsob extrakce opět závisí na charakteru výchozího materiálu a izolovaných makromolekul.

Proteiny z homogenizovaných živočišných a rostlinných tkání se extrahují 2 - 5 násobným objemem pufru, který by měl mít dostatečně velkou pufrací kapacitu, aby extrakce probíhala při takovém pH, při kterém je izolovaný protein stabilní. Pro většinu proteinů je výhodné pracovat za snížené teploty (4 °C), kdy jsou denaturační a degradační procesy značně zpomaleny. Nebezpečím pro izolovaný protein jsou hydrolytické enzymy, především proteasy, které jsou v biologickém materiálu vždy přítomny a mohou velmi ovlivnit úspěšnost izolace. Účinku těchto degradačních enzymů mohou do značné míry zabránit inhibitory proteas, které se přidávají do extrakčního pufru. Při extrakci proteinů z rostlin je třeba počítat s pevnou buněčnou stěnou rostlinných buněk, která může být rozrušena buď mechanicky nebo enzymově celulasami a hemicelulasami. K inaktivaci proteinů izolovaných z rostlin může vedle výše zmíněných degradačních enzymů vést i množství uvolněných fenolů obsažených v rostlinách. Do extrakčních pufrů se proto přidává polyvinylpyrrolidon, který vytváří s fenoly nerozpustné komplexy. Je-li izolovaný protein součástí nějaké subcelulární struktury, např. mitochondrií, je výhodné zbavit se zbytku buňky

diferenční centrifugací. Membránové proteiny je třeba izolovat pomocí tenzidů a organických látek rozpouštějících tuky.

### 1.1.3 Precipitace

V přírodě se látky vyskytují většinou ve směsích, a to ve směsích často velmi složitých. Proto se v biochemii a v chemii přirozených látek vůbec setkáváme s nutností umět rozdělit složité směsi nebo oddělit jednu látku z takové směsi. K tomu slouží separační techniky.

V počátečních fázích izolací biopolymerů jsou většinou používány méně pracné metody fázové separace, jako jsou precipitace (frakcionace), dialýza či vsádková adsorpce. Tyto metody nemají zpravidla velké rozlišení, umožňují však snadné a rychlé zakoncentrování preparátu po základní extrakci biologického materiálu. Srážení se provádí pomocí neutrálních solí, změnou pH, organickými rozpouštědly či teplotou.

Rozpustnost proteinů ve vodných roztocích závisí na jejich solvatačním obalu, tj. vrstvě molekul vody a iontů, které obalují jejich molekuly. Příčinou solvatačních obalů jsou elektrostatické síly mezi polárními strukturami proteinů a dipóly vody. **Rozpustnost proteinů se s rostoucí koncentrací solí zpravidla nejprve zvyšuje (vsolovací efekt), prochází maximem a posléze klesá (vysolovací efekt).** Vsolování je způsobeno vytvořením iontového oblaku kolem ionizovaných skupin biopolymerů – dochází ke snížení interakce nabitých skupin biopolymerů mezi sebou a zvýšení interakcí s rozpouštědlem. Dalším přídavkem neutrální soli se snižuje tloušťka solvatačního obalu a efektivní koncentrace vody, a tím se snižuje i rozpustnost proteinu. Charakter závislosti rozpustnosti na koncentraci soli je určen nejen typem biopolymeru, ale i typem soli a hodnotou pH. Nejnižší je rozpustnost v izoelektrickém bodě, tj. hodnota pH, při které má molekula biopolymeru neutrální náboj.

Při frakcionaci organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou (methanol, ethanol, aceton) se využívá rozdílná rozpustnost proteinů v těchto rozpouštědlech a ve vodě. Zvyšováním koncentrace organického rozpouštědla se zmenšuje i solvatační obal kolem molekul proteinů, což nakonec vede k jejich vysrážení. Frakcionace organickými rozpouštědly se může kombinovat se změnami koncentrace solí, pH a teploty.

### *Tepelná denaturace nežádoucích látek*

Tato metoda se používá zejména při izolaci některých termostabilních enzymů v počátečních fázích purifikačního procesu. Často se do roztoku přidává substrát, koenzym nebo inhibitor příslušného enzymu, neboť přítomnost těchto látek vede k tvorbě komplexů enzym – ligand, které se zpravidla vyznačují zvýšenou odolností vůči denaturačním vlivům. Roztok je zahřát po jistou dobu na určitou teplotu, pak je rychle ochlazen v ledové lázni a koagulované balastní biopolymery, zejména termolabilní proteiny, se odstraní centrifugací nebo filtrací.

### *Vysolování biopolymerů neutrálními solemi*

Precipitovatelnost určitého proteinu z vodného roztoku je závislá na druhu použité soli, iontové síle, hodnotě pH, teplotě a koncentraci proteinů. Při vysolovacím efektu se uplatňuje daleko více povaha aniontu než kationtu. Dvojmocné a vícemocné anionty precipitují proteiny většinou mnohem účinněji než anionty jednomocné. Nejčastěji používanou solí pro vysolování biopolymerů je síran amonný. Jeho výhodou je značná rozpustnost (např.

ve srovnání s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), která je jen nepatrně závislá na teplotě, a malý denaturační vliv. Doporučuje se používat dostatečně čistý síran amonný bez obsahu kovových iontů, které by mohly interagovat s proteiny a katalyzovat některé oxidační reakce. Jiné soli se používají jen ve speciálních případech, např. síran hořečnatý k izolaci  $\gamma$ -globulinové frakce ze séra nebo chlorid sodný k precipitaci fibrinogenu. Díky své velké kapacitě a tlumivé schopnosti by byly fosforečnany ideálními srážedly, ale pro svou špatnou rozpustnost se v praxi používají jen velmi omezeně. Často používanou solí pro precipitaci některých enzymů je i chlorid manganatý.

Vlastní precipitace se provádí tak, že se do roztoku biopolymerů sůl zpravidla přidává po malých dávkách v pevném stavu nebo jako nasycený vodný roztok za stálého míchání, aby nedošlo k lokálnímu přesycení. Vysolování probíhá při konstantní teplotě, chlazení není vždy nezbytné. Optimální koncentrační rozsah pro frakcionaci daného proteinu je nutno najít empiricky. Množství síranu amonného, potřebného k dosažení určitého stupně nasycení, lze snadno zjistit z tabulky 1. Po přidání takového množství síranu amonného, které odpovídá 30% množství potřebného ke vzniku nasyceného roztoku této soli (v praxi označováno jako 30% nasycení), se srážejí nukleové kyseliny a poměrně málo proteinů. Mezi 30 – 75% nasycení pak precipituje většina proteinů. V tomto rozmezí je třeba nasycení zvyšovat po poměrně malých dávkách. Po přidání příslušného množství soli se roztok biopolymeru míchá ještě asi 20 minut a precipitát se oddělí centrifugací. Pokud je daný biopolymer obsažen v precipitátu, lze po rozpuštění sraženiny získat jeho koncentrovaný roztok. Síran amonný se z roztoku oddělí většinou dialýzou, gelovou chromatografií nebo ultrafiltrací.

Tabulka 1 - Množství pevného síranu amonného, které je třeba přidat k jednomu litru roztoku, aby se dosáhlo žádané změny v procentech saturace roztoku síranem amonným.

Výsledná koncentrace síranu amonného (% saturace)

|    | 10 | 15 | 20  | 25  | 30  | 33  | 35  | 40  | 45  | 50  | 55  | 60  | 65  | 70  | 75  | 80  | 85  | 90  | 95  | 100 |
|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0  | 56 | 84 | 114 | 144 | 176 | 196 | 209 | 243 | 277 | 313 | 351 | 390 | 430 | 472 | 516 | 561 | 610 | 662 | 713 | 767 |
| 10 |    | 28 | 57  | 86  | 118 | 137 | 150 | 183 | 216 | 251 | 288 | 326 | 365 | 406 | 449 | 494 | 540 | 592 | 640 | 694 |
| 15 |    |    | 28  | 57  | 88  | 107 | 120 | 153 | 185 | 220 | 256 | 294 | 333 | 373 | 415 | 459 | 506 | 556 | 605 | 657 |
| 20 |    |    |     | 29  | 59  | 78  | 91  | 123 | 155 | 189 | 225 | 262 | 300 | 340 | 382 | 424 | 471 | 520 | 569 | 619 |
| 25 |    |    |     |     | 30  | 49  | 61  | 93  | 125 | 158 | 193 | 230 | 267 | 307 | 348 | 390 | 436 | 485 | 533 | 583 |
| 30 |    |    |     |     |     | 19  | 30  | 62  | 94  | 127 | 162 | 198 | 235 | 273 | 314 | 356 | 401 | 449 | 496 | 546 |
| 33 |    |    |     |     |     |     | 12  | 43  | 74  | 107 | 142 | 177 | 214 | 252 | 292 | 333 | 378 | 426 | 472 | 522 |
| 35 |    |    |     |     |     |     |     | 31  | 63  | 94  | 129 | 164 | 200 | 238 | 278 | 319 | 364 | 411 | 457 | 506 |
| 40 |    |    |     |     |     |     |     |     | 31  | 63  | 97  | 132 | 168 | 205 | 245 | 285 | 328 | 375 | 420 | 469 |
| 45 |    |    |     |     |     |     |     |     |     | 32  | 65  | 99  | 134 | 171 | 210 | 250 | 293 | 339 | 383 | 431 |
| 50 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     | 33  | 66  | 101 | 137 | 176 | 214 | 256 | 302 | 345 | 392 |
| 55 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 33  | 67  | 103 | 141 | 179 | 220 | 264 | 307 | 353 |
| 60 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 34  | 69  | 105 | 143 | 183 | 227 | 269 | 314 |
| 65 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 34  | 70  | 107 | 147 | 190 | 232 | 275 |
| 70 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 35  | 72  | 111 | 153 | 194 | 237 |
| 75 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 36  | 74  | 115 | 155 | 198 |
| 80 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 38  | 77  | 117 | 157 |
| 85 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 39  | 77  | 118 |
| 90 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 38  | 77  |
| 95 |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 39  |

Výchozí koncentrace síranu amonného (% saturace)

#### 1.1.4 Centrifugace

Centrifugace čili odstředování patří k nejběžnějším operacím v biochemické laboratoři. Dovoluje oddělit složky suspenze nebo emulze na základě rozdílných hustot. Bývá často rychlejší a pohodlnější než filtrace a v některých případech vede i k lepšímu oddělení pevné a kapalné fáze. Kromě nahrazení nebo doplnění filtrace, zvláště je-li suspendovaná látka velmi jemná, špatně filtrovatelná a filtrace zdlouhavá, má odstředování v biochemii i jiný

význam. Slouží k některým speciálním preparativním a analytickým účelům (např. izolace mitochondrií diferenční centrifugací). Dále je to příprava buněčných struktur gradientovou centrifugací a z analytických aplikací pak především stanovení relativních molekulových hmotností sloučenin a stanovení čistoty izolovaných preparátů.

Při odstředování působí na sedimentující částice odstředivá síla ( $P$ ), kterou lze vyjádřit vztahem  $P = m \cdot r \cdot \omega^2$ , kde  $m$  je hmotnost částice,  $r$  je poloměr otáčení a  $\omega$  je úhlová rychlost. Pro praktické výpočty se však zavádí veličina relativní odstředivé zrychlení  $R$ , které udává, kolikrát je toto zrychlení větší než zemské gravitační zrychlení  $g$  a je dána vztahem  $R = 1,118 \cdot r \cdot N^2 \cdot 10^{-5}$ , kde  $N$  je počet otáček za minutu a  $r$  je poloměr otáčení v cm. Je nutno ji uvádět jako hlavní charakteristiku centrifugace. Ze vzorce je zřejmé, že pouhý údaj počtu otáček za minutu necharakterizuje proces centrifugace.

Existuje celá řada typu centrifug, které se liší velikostí (od malých stolních až po velkoobjemové průmyslové odstředivky), dosahovaným zrychlením a tvarem rotorů (výkyvné a úhlové). Ve výkyvných rotorech jsou kyvety uloženy v pouzdrech, která jsou volně zavěšena v čepch vlastního rotoru a kyvety jsou během odstředování ve vodorovné poloze. Naproti tomu v úhlových rotorech jsou kyvety fixovány v určitém úhlu (45 - 50°) k ose otáčení.

Zvláštní kategorii tvoří ultracentrifugy, na nichž lze dosáhnout relativního odstředivého zrychlení  $100000 \times g$  a více. Liší se od běžných centrifug zejména tím, že prostor s rotorem musí být při odstředování evakuován. Používají se pro dělení biopolymerů a subcelulárních částic v hustotním gradientu sacharosy nebo cesných solí. Tyto techniky lze provádět jak v analytickém, tak i v preparativním měřítku. Analytické centrifugy jsou navíc opatřeny optickým zařízením umožňujícím sledovat rozhraní tvořená jednotlivými sedimentujícími látkami.

Pro většinu prací preparačních i analytických jsou požadovány centrifugy chlazené. Chlazení centrifug je zajišťováno chladicími agregáty, zabudovanými do jediného provozního celku s centrifugou a je ovládáno termostatem. **Protilehlé kyvety (u vysokootáčkových centrifug všechny kyvety) musejí být staticky a dynamicky vyváženy. Z bezpečnostních důvodů i z hlediska ochrany centrifugy je nutno klást na vyvažování kyvet zvýšenou pozornost. Každá nepřesnost v dynamickém i statickém vyvážení se mnohonásobně projeví zvětšením odstředivého tlaku na jednu stranu osy. Osa se nerovnovázným zatížením snadno ohne nebo se poškodí ložisko.** Při chodu odstředivky se při nepřesném vyvážení projevují silné vibrace. Statického vyvážení se dosáhne tak, že se na technických váhách s přesností na jeden gram vyváží protilehlá pouzdra s kyvetami naplněnými suspenzí určenou k centrifugaci. Daleko větší pozornost je třeba klást dynamickému vyvážení protilehlých kyvet. Protilehlé kyvety musí mít stejnou velikost, hmotnost a stejně umístěné těžiště. To znamená, že protilehlé kyvety musí být naplněny stejnou suspenzí, přesněji řečeno suspenzí o stejné hustotě. Nelze tedy například při precipitaci síranem amonným kyvetu s tímto roztokem vyvážit kyvetou s destilovanou vodou.

## POJMY

**Pelet** - pevná, usazená část po centrifugaci

**Supernatant** - čirá kapalina nad precipitátem

### 1.1.5 Dialýza

Tato separační technika využívá difúze nízkomolekulárních látek membránou nepropustnou pro velké molekuly a částice z roztoku o vyšší koncentraci do roztoku o koncentraci nižší. V okamžiku, kdy se koncentrace látek procházejících membránou na obou stranách membrány vyrovnají, proces se zastaví. Molekuly proteinů neprocházejí pro svou velikost otvory dialyzačních membrán, naopak molekuly vody procházejí ve směru osmotického tlaku, což má dva praktické dopady: vzorek se naředí a nabude na objemu. Dialýza umožňuje v biochemii např. snadné oddělení solí od roztoků proteinů (při vysolování proteinů síranem amonným), uplatňuje se i při krystalizaci proteinů. Nejčastěji se využívá tam, kde chceme vysokomolekulární látky zbavit nízkomolekulárních nečistot.

Dříve se používaly pro dialýzu membrány typu kolodium, celofán, pergamen anebo i membrány zvířecího původu (střevo, vaječná blánka, různé měchýře). Nyní jsou komerčně dostupné umělé membrány s vhodnou velikostí pórů ve tvaru dlouhé trubice různého průměru, běžným laboratorním slangem nazývané dialyzační střevo. Potřebný díl dialyzační trubice se odstříhne a na jednom konci pevně zaváže nebo uzavře speciální svorkou. Před naplněním novou trubicí vždy pořádně propláchneme a necháme chvíli namočenou v destilované vodě, je třeba vymýt glycerol, kterým jsou trubice impregnovány. Po naplnění preparátem určeným k dialýze se uzavře i druhý konec trubice a vloží se do nádoby s vodou nebo pufrům o nízké iontové síle. Snažíme se, aby dialýza byla co nejrychlejší. Rychlost dialýzy závisí na koncentračním spádu (zpočátku je rychlejší, postupně se zpomaluje), který je ovlivněn především poměrem objemů vně a uvnitř membrány. Rychlost tohoto procesu dále závisí na teplotě, na počtu a velikosti pórů v membráně, na síle membrány, na elektrických interakcích mezi membránou a difundujícími částicemi a na velikosti plochy membrány. Míchání a obvykle i výměna kapaliny velmi zrychlují postup dialýzy. Protože dialýza trvá zpravidla desítky hodin, provádí se obvykle přes noc při teplotě 0 – 4 °C, aby se zabránilo denaturaci proteinů a množení mikroorganismů.

### 1.1.6 Odvození vztahu pro výpočet koncentrace produktu a výpočet aktivity enzymu

Odvození vztahu pro výpočet koncentrace produktu a výpočet aktivity enzymu si ukážeme na konkrétním příkladu ze cvičení, pro stanovení aktivity enzymu aminoxidasy.

Rovnice 1.1: Lambert-Beerův zákon.

$$\Delta A = \Delta c \cdot \varepsilon \cdot l$$

$\Delta A$ ... změna absorbance

$\Delta c$ ... změna koncentrace tetraguajakolchinonu

$\varepsilon$ ... molární absorpční koeficient 4500 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$l$ ... délka optické dráhy kyvety (cm)

Během cvičení měříme změnu absorbance, což je hodnota odečítaná ze spektrofotometru a udává rozdíl mezi počátkem a koncem měření, jež trvalo 60 s. Po dosazení do vztahu zbývá jediná proměnná  $\Delta c$ , která je přímo úměrná změně absorbance.

Rovnice 1.2: Vyjádření koncentrace z Lambert-Beerova zákona.

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot l}$$

Dosazením do vztahu 1.2 získáme změnu koncentrace produktu enzymové reakce. V dalších výpočtech však budeme potřebovat vztah pro výpočet látkového množství produktu. K tomu potřebujeme vztah 1.3.

Rovnice 1.3: Výpočet látkového množství ( $\Delta n$ ).

$$\Delta n = \Delta c \cdot V$$

Aktivita enzymu odpovídá rychlosti katalyzované reakce. Udává se buď v mezinárodních jednotkách (IU), nebo v katalích, což je jednotka patřící do soustavy jednotek SI. Jeden katal je množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za jednu sekundu při 30 °C.

Rovnice 1.4: Výpočet aktivity enzymu.

$$\text{aktivita enzymu} = \frac{\Delta n}{\Delta t}$$

$\Delta n$ ... změna látkového množství substrátu (případně produktu, pak je ale potřeba zohlednit stechiometrii reakce!) (jednotka mol)

$\Delta t$ ... změna (jednotka sekunda)

Při reakci putrescinu s aminoxidasou měříme nárůst produktu peroxidu vodíku, úloha však využívá tzv. spřažené reakce, kdy je do reakční směsi přidána i peroxidasa, díky níž vzniká barevný tetraguajakolchinon. Obě reakce probíhají ve stechiometrickém poměru 1:1. Při výpočtu aktivity aminoxidasy tedy můžeme uvažovat, že z jedné molekuly zreagovaného substrátu vznikne jedna molekula produktu, a tak můžeme v úvaze postupovat takto:

Rovnice 1.5: Po dosazení z rovnice 1.2 do rovnice 1.3 získáme následující vztah pro výpočet látkového množství produktu (odpovídá i koncentraci přeměněného substrátu), který využijeme při výpočtu aktivity enzymu.

$$\Delta n = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot l} \cdot V$$

Rovnice 1.6: Výpočet aktivity enzymu po dosazení ze vztahu 1.5 do rovnice 1.4.

$$\text{aktivita enzymu} = \frac{\Delta A \cdot V}{\varepsilon \cdot t \cdot l}$$

$V$ ... celkový objem v kyvetě (jednotka litr)

Jednotka aktivity je z definice mol/s, což se triviálně označuje jako katal.

### 1.1.7 Vyhodnocení purifikace enzymů

Mírou čistoty enzymu je specifická aktivita ( $a_s$ ), která narůstá v průběhu purifikačního procesu. Obecně se z výchozího materiálu (frakce 0) purifikačními kroky (srážení, extrakce, chromatografie, aj.) získávají další frakce (N). Pro kvantitativní hodnocení se pro každou frakci provede její charakterizace - experimentálně se určí množství (objem  $V_N$ ), celková aktivita ( $a_N$ ) a hmotnost bílkoviny ( $m_N$ ).

Následně se spočítají pro každou frakci:

specifická aktivita  $a_{s,N} = a_N/m_N$

výtěžek  $= (a_N/a_0) \cdot 100\%$

stupeň přečištění  $= a_{s,N}/a_{s,0}$

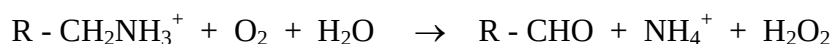
Výsledek purifikace se pak přehledně zobrazí ve formě purifikační tabulky.

## 1.2 Aminoxidasy

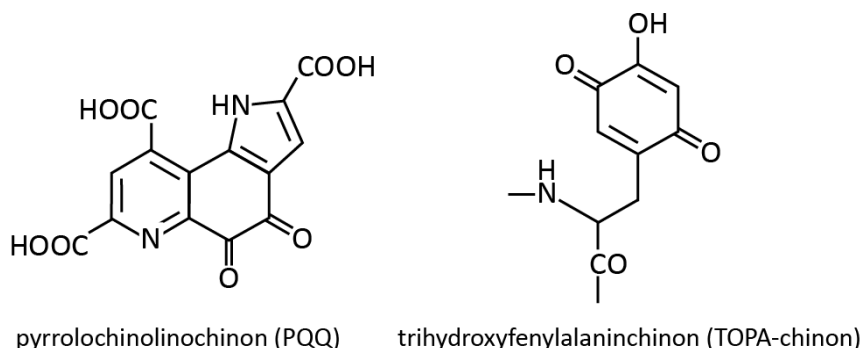
Aminoxidasy jsou obecně rozšířené enzymy, které lze dělit dle substrátové specifity do tří skupin:

- **monoaminoxidasy** (obsahující flavin), zkr. MAO, EC 1.4.3.4; amin:O<sub>2</sub> oxidoreduktasa (deaminační, obsahující flavin). Jsou obsaženy v krvi, mitochondriích a v celé řadě rostlinných čeledí, ale vždy ve velmi nízké aktivitě. Katalyzují oxidaci primárních aminů, obvykle také sekundárních a terciárních s malými substituenty.
- **aminoxidasy** (obsahující měď), zkr. AO, EC 1.4.3.6; amin:O<sub>2</sub> oxidoreduktasa (deaminační, obsahující měď). Jsou typické zejména pro placentu, kůru ledvin a bobovité rostliny jako hrách, sója, vojtěška, jetel, čočka apod.) Typickými substráty jsou diaminy putrescin (butan-1,4-diamin) a kadaverin (pentan-1,5-diamin), a proto jsou také někdy označovány jako diaminoxidasy (zkratka DAO).
- **polyaminoxidasy** (obsahující flavin), zkr. PAO, nemají zařazení v EC, jsou typické pro trávy a obilniny, substráty jsou spermin (*N,N'*-3-aminopropylputrescin) a spermidin (*N*-3-aminopropylputrescin).

Všechny aminoxidasy spotřebovávají k oxidaci substrátu kyslík a produkují peroxid vodíku, amonný ion a příslušný aldehyd:



Většina polyaminoxidasy jsou flavoproteiny, obsahující jako kofaktor FAD. Organické kofaktory ostatních aminoxidasy se podařilo identifikovat až v posledních letech. Některé mikrobiální aminoxidas (např. methylaminoxidasa) obsahují kovalentně vázaný pyrrolochinolinochinon (zkratka PQQ), zatímco aminoxidas (obsahující měď) mají jako kofaktor trihydroxyfenylalaninichinon (TOPA-chinon), který vzniká posttranslační modifikací peptidově vázaného tyrosinu (Obr. 1).

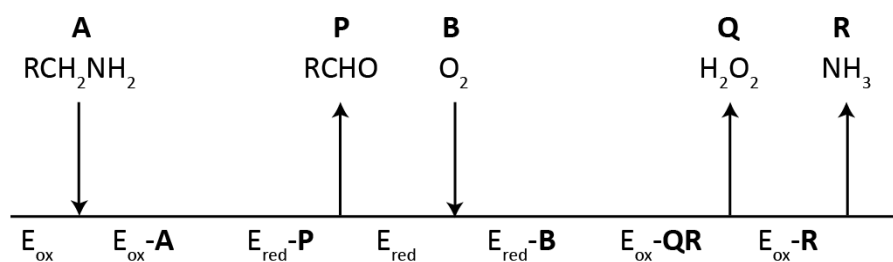


Obr. 1 Pyrrolochinolinochinon (PQQ), trihydroxyfenylalaninichinon (TOPA-chinon).



Vhodným enzymem pro potřeby laboratorního cvičení zaměřeného na problematiku enzymologie je enzym aminoxidas izolovaný z klíčků hrachu (PSAO). PSAO má dimerní strukturu a obsahuje organický kofaktor TOPA-chinon a měď ve formě Cu(II) v každé z podjednotek. Relativní molekulová hmotnost PSAO v nativním stavu (dimer) je 150 kDa. Výchozím materiálem pro purifikaci rostlinných Cu-aminoxidas jsou nejčastěji etiolované 7–10 denní semenáčky. Purifikační metody zahrnují homogenizaci rostlinného materiálu ve vhodném pufru, hrubé přečištění extraktu, jeho zakoncentrování a řadu chromatografických postupů. Pro hrubé přečištění extraktu lze použít metody srážení balastních bílkovin síranem amonným, chloridem manganatým či protaminsulfátem nebo řízenou tepelnou denaturaci balastních bílkovin. Pro izolaci aminoxidas se využívá chromatografie na celulosových iontoměničích, na hydroxyapatitu a gelová permeační chromatografie.

Pro stanovení aktivity aminoxidas byla vypracována řada různě specifických a citlivých metod. Metoda, kterou budeme dále využívat je založena na spektrofotometrickém stanovení žlutohnědého zbarvení indikujícího aminoxidasovou reakcí vzniklý peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku je za přítomnosti peroxidasy (EC 1.11.1.6) a bezbarvého guajakolu (*o*-methoxyfenol) rozkládán na kyslík a vodu. Kyslík oxiduje guajakol za vzniku žlutohnědého tetraguajakolochinonu s absorpčním maximem při 436 nm. Nárůst absorbance při 436 nm v čase odpovídá vznikajícímu peroxidu vodíku a tedy aktivitě aminoxidas. Vhodnými substráty aminoxidas z klíčků hrachu jsou diaminy putrescin a kadaverin. Kadaverin je dokonce oxidován za přítomnosti aminoxidas rychleji než putrescin, který je však běžnější a dostupnější. Aminoxidas je dvousubstrátový enzym, prvním substrátem je diamin a druhým kyslík. Mechanismus aminoxidasové reakce má ping-pongový charakter, jak je naznačeno v Clelandově schématu. V anaerobní fázi reakce dochází nejdříve k reakci enzymu s aminoskupinou aminu (A), uvolní se odpovídající aldehyd (P) a vzniká redukováná forma enzymu ( $E_{\text{red}}$ ). Reakcí redukováné aminoxidas s molekulárním kyslíkem (B) dochází k uvolnění  $H_2O_2$  (Q) a  $NH_3$  (R), což je spojeno s reoxidací enzymu ( $E_{\text{ox}}$ ) (Obr. 2).



Obr. 2 Clelandovo schéma bi-ter ping-pongového mechanismu aminoxidasové reakce.

## 2 Praktická část

### 2.1 Izolace aminoxidasy a stanovení její aktivity

#### 2.1.1 Cíle úlohy

- Praktické provedení izolace a purifikace enzymu aminoxidasy
- Stanovení enzymové aktivity a koncentrace proteinů Bradforodovou metodou
- Seznámení se s výpočty enzymové aktivity a úspěšností purifikačního procesu
- Trénink pipetování, práce s centrifugou a spektrofotometrem

#### 2.1.2 Vybavení

##### 2.1.2.1 Materiál

Jako výchozí materiál pro izolaci aminoxidasy budou použity 7–10 denní rostliny hrachu pěstované ve tmě při teplotě 22 °C (ethiolované rostliny).

##### 2.1.2.2 Přístroje

- Chlazená centrifuga, elektromagnetická míchačka, spektrofotometr, digitální předvážky, vortex

##### 2.1.2.3 Chemikálie

- Coomassie Brilliant Blue G-250, síran amonný, ethanol, křenová peroxidasa, putrescin, hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, guajakol, kyselina fosforečná

##### 2.1.2.4 Roztoky

- **Bradfordovo činidlo**  
100 mg Coomassie brilliant blue G-250 (0,01% w/v), 50 ml 95% ethanol (5% konečná koncentrace), 100 ml 85% kyselina fosforečná, doplní se vodou do 1 l.
- **0,01% křenová peroxidasa**  
5 mg peroxidasy se rozpustí ve vodě a upraví se objem na 50 ml.
- **0,1 M K-fosfátový pufr pH 7**  
5,45 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 12,23 g hydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí v 800 ml vody. Upraví se pH na hodnotu 7 a doplní na objem 1 l.
- **0,035 M guajakol**  
196 mg guajakolu se rozpustí ve vodě a doplní do objemu 50 ml.
- **87,5 mM putrescin**  
140,96 mg putrescinu se rozpustí ve vodě a doplní do objemu 10 ml.

### 2.1.3 Postup

#### 2.1.3.1 Izolace aminoxidasy

**Vychlad'te centrifugu na 4 °C. Do centrifugy vkládejte pouze očištěné a osušené falkony!**

##### *Příprava hrubého extraktu:*

1. 20 g zmrazených desetidenních ethiolovaných rostlin hrachu nastříhejte na 1 cm kousky do třecí misky a po přidání mořského písku rozetřete na kaši. Postupně přidávejte 40 ml 0,1 M K-fosfátového pufru pH 7.
2. Získaný homogenát přefiltrujte (vymačkejte) přes nylonovou tkaninu a kapalný podíl centrifugujte na chlazené centrifuze (15 min, 7 000 g, 4 °C). Před vlastní centrifugací je nutné kyvety pečlivě vyvážit.
3. Supernatant slijte do 50 ml válečku, zaznamenejte si objem a odeberte **vzorek č. 1** (2 ml) na stanovení aktivity aminoxidasy a obsahu proteinů. Vzorky odebírané v průběhu izolace uchovávejte v ledové lázni.

*Takto získaný supernatant označujeme jako hrubý extrakt.*

##### *Precipitace síranem amonným a dialýza:*

*Dalším purifikačním krokem bude frakcionační srážení síranem amonným a následná dialýza.*

1. Na základě odměřeného objemu supernatanu navažte do připravené misky síran amonný (176 g na 1 l roztoku).
2. Přídavkem síranu amonného do 30% nasycení vysrážejte z rostlinného homogenátu část balastních bílkovin. K supernatantu z předešlého kroku v průběhu 15 min postupně přidávejte odvážené množství síranu amonného. Roztok po dobu srážení míchejte na míchačce a chlad'te. Pět minut po posledním přídavku síranu amonného rozdělte objem v kádince do dvou centrifugačních kyvet, které vyvažte na předvážkách.
3. Centrifugací odstraňte vzniklou sraženinu (15 min, 7 000 g, 4 °C). Supernatant slijte do 50 ml válečku, změřte objem a odeberte **vzorek č. 2** (2 ml). Se sraženinou, která obsahuje balastní bílkoviny, dále nebudete pracovat.
4. Na základě odměřeného objemu supernatanu navažte do připravené misky síran amonný (273 g na 1 l roztoku).
5. Enzym s aminoxidasovou aktivitou vysrážejte ze získaného supernatanu přídavkem síranu amonného do 70% nasycení (na 70% nasycení roztoku obsahujícího již 30 % síranu amonného je třeba 273 g síranu amonného do 1 l). Postupujte stejně jako v předchozím kroku.
6. Vysrážené proteiny odstraňte centrifugací (15 min, 7 000 g, 4 °C). Supernatant slijte do válečku, zaznamenejte si objem a odeberte **vzorek č. 3** (2 ml). Sraženinu obsahující aminoxidasu rozpust'te v 5 ml 0,1 M K-fosfátového pufru pH 7. Odeberte **vzorek č. 4** (0,5 ml).

7. Sraženinu rozpuštěnou v pufru z předešlého kroku dialyzujte proti 0,1 M K-fosfátového pufru pH 7. Takto připravený enzym je dostatečně aktivní a vhodný pro další kinetická měření. **Z časových důvodů se tento krok ve cvičení vynechává.**

### 2.1.3.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity aminoxidasy

*Připravte si reakční směs pro 20 měření*

- 30 ml 0,1 M K-fosfátového pufru pH 7
- 0,5 ml 0,035 M guajakolu
- 0,5 ml 0,01% křenové peroxidasy

**Do spektrofotometru vkládejte pouze očištěné a osušené kyvety!**

*Dle následujícího postupu stanovte aktivitu aminoxidasy*

1. Zapněte spektrofotometr.
2. Vyberte možnost Applications (1), dále zvolte Kinetics (4), nastavte vlnovou délku 436 nm, měření kinetiky po dobu 1 minuty v intervalech po 30 s, potvrďte zeleným tlačítkem OK.
3. K 1,55 ml reakční směsi v kyvetě přidejte 0,15 ml vzorku č. 1, 2 nebo 3,  
nebo 0,05 ml vzorku č. 4 a 0,1 ml vody.
4. Kyvetu vložte do kyvetového prostoru spektrofotometru.
5. Zmáčkněte modré tlačítko pro blank.
6. Reakci startujte přidáním 0,05 ml 87,5 mM putrescinu přímo do kyvety v kyvetovém prostoru. Pro měření stiskněte co nejrychleji zelené tlačítko. Naměřené hodnoty změny absorbancí za 1 minutu si запиšte.
7. Každé měření opakujte 3x.

V případě, že změna absorbance za 1 minutu je nižší než 0,1 nebo vyšší než 1, upravte, po konzultaci s vedoucím cvičení objem vzorku aplikovaný do reakční směsi případně dobu měření.

### 2.1.3.3 Stanovení obsahu bílkoviny Bradfordovou metodou

- Pro stanovení obsahu bílkoviny 100x zřeďte vzorek 1, 2 a 3 a 500x vzorek 4.
- K 1 ml extrakčního pufru (blank) nebo vhodně zředěného vzorku přidejte 2 ml barevného Bradfordova činidla.
- Roztoky promíchejte na vortexu a po 5 minutách změřte absorbanci při 595 nm.
- Zapněte spektrofotometr. Vyberte možnost Applications (1), dále zvolte Single wavelength (1), nastavte vlnovou délku 595 nm, potvrďte zeleným tlačítkem OK.
- Do kyvetového prostoru umístěte kyvetu se slepým vzorkem (blank). Před tím, než kyvetu vložíte do spektrofotometru, je nutné se ujistit, že kyveta je zvenku suchá, případně ji osušit papírovým ubrouskem.
- Zmáčkněte modré tlačítko pro blank.
- Vzorek z kyvety vylijte a nahraďte postupně vzorky 1-4. Pro měření stiskněte zelené tlačítko. Naměřené hodnoty absorbancí si запиšte.

- Pokud naměřená hodnota nebude v rozsahu 0,05–0,5, upravte ředění vzorku. Každé měření proveďte 2x.

#### 2.1.4 Vyhodnocení

- Vypočítejte aktivitu enzymu, specifickou aktivitu, výtěžek a stupeň přečištění. Vyplňte níže uvedenou tabulku 2.
- Určete obsah proteinů ve vzorcích 1-4. Pro výpočet využijte kalibrační křivku na BSA ( $y = 0,0243x$ ). Nezapomeňte, jaká množství vzorků z celkového objemu jste ke stanovení použili.
- Specifická aktivita je aktivita v daném objemu dělena množstvím proteinu.
- Stupeň přečištění se vypočte ze specifických aktivit tak, že prvnímu kroku se přidělí hodnota 1.
- Celková aktivita enzymu v prvním izolačním kroku (příprava rostlinného extraktu) odpovídá 100% výtěžku.
- Výsledky zaznamenejte do následující tabulky.

Tabulka 2 Vyhodnocení úspěšnosti purifikačního postupu.

| Izolační krok            | Celkový objem (ml) | Celková aktivita (nkat) | Celková bílkovina (mg) | Specifická aktivita (nkat/mg) | Výtěžek (%) | Stupeň přečištění |
|--------------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------|-------------------|
| Extrakt (supernatant)    |                    |                         |                        |                               | 100         | 1                 |
| 1. srážení (supernatant) |                    |                         |                        |                               |             |                   |
| 2. srážení (supernatant) |                    |                         |                        |                               |             |                   |
| 2. srážení (sraženina)   |                    |                         |                        |                               |             |                   |