|  |  |
| --- | --- |
| **jméno:** | |
| **obor:** | **datum provedení:** |

# OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Enzymy, klasifikace enzymů. Enzymové reakce. Substrát, produkt. Amylasová, lipasová, proteasová, nitrátreduktasová a nitritreduktasová reakce.

**Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení). Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): část A. Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): část A.**

# ÚVOD

**Enzymy** jsou převážně jednoduché či složené **bílkoviny\* s** [**katalytickou**](http://cs.wikipedia.org/wiki/Katalyz%C3%A1tor) **aktivitou**. Enzymy určují povahu i rychlost chemických reakcí a řídí většinu biochemických procesů.

Základní složkou enzymů jsou [proteiny](http://cs.wikipedia.org/wiki/Protein), na něž se velmi často vážou další přídatné molekuly - [kofaktory](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kofaktor) nebo [prostetické skupiny](http://cs.wikipedia.org/wiki/Prostetick%C3%A1_skupina), které se podílí na katalýze. Samotná enzymatická reakce probíhá obvykle v tzv. [**aktivním místě**](http://cs.wikipedia.org/wiki/Aktivn%C3%AD_m%C3%ADsto)enzymu. Enzymy obvykle přeměňují jeden nebo několik málo substrátů, a to jedním definovaným způsobem. Aktivita enzymů, spočívající v ovlivnění rychlosti chemických reakcí snižováním jejich aktivační energie, je závislá zejména na koncentraci substrátu, teplotě, [pH](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselost) a přítomnosti [aktivátorů](http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Aktiv%C3%A1tor&action=edit&redlink=1) a [inhibitorů](http://cs.wikipedia.org/wiki/Inhibitor).

V buňkách se enzymy vyskytují buď volně v cytoplazmě, nebo vázané na buněčné struktury (membrány). K svému účinku vyžadují určitou optimální teplotu a pH.

Enzymy se dělí do šesti hlavních kategorií:

* EC 1 – [oxidoreduktázy](http://cs.wikipedia.org/wiki/Oxidoredukt%C3%A1za): katalyzují oxidačně/redukční reakce
* EC 2 – [transferázy](http://cs.wikipedia.org/wiki/Transfer%C3%A1za): přenášejí funkční skupiny
* EC 3 – [hydrolázy](http://cs.wikipedia.org/wiki/Hydrol%C3%A1za): katalyzují hydrolýzu chemických vazeb
* EC 4 – [lyázy](http://cs.wikipedia.org/wiki/Ly%C3%A1za): štěpí chemické vazby jiným způsobem než hydrolýzou či redoxní reakcí
* EC 5 – [izomerázy](http://cs.wikipedia.org/wiki/Izomer%C3%A1za): katalyzují [isomerizační](http://cs.wikipedia.org/wiki/Isomer) reakce
* EC 6 – [ligázy](http://cs.wikipedia.org/wiki/Lig%C3%A1za): spojují dvě molekuly kovalentní vazbou

\*některé molekuly RNA mohou také vykazovat enzymovou aktivitu

**CÍL PRÁCE**

### A) Trávicí enzymy pankreatické šťávy

**Slinivka břišní** (**pankreas)** je žláza, která patří mezi [orgány](http://cs.wikipedia.org/wiki/Org%C3%A1n) [trávicí soustavy](http://cs.wikipedia.org/wiki/Tr%C3%A1v%C3%ADc%C3%AD_soustava). V slinivce se produkuje řada enzymů, z nichž nejdůležitější jsou:

* **amylasy** – hydrolyzují poly[sacharidy](http://cs.wikipedia.org/wiki/Sacharidy), nejvýznamnější je alfa-amylasa štěpící škrob na maltosu (stejné účinky má slinná amylasa)
* **lipasy** – hydrolyzují [tuky](http://cs.wikipedia.org/wiki/Tuky) na [glycerol](http://cs.wikipedia.org/wiki/Glycerol) a [mastné kyseliny](http://cs.wikipedia.org/wiki/Mastn%C3%A9_kyseliny)
* **proteasy** (především [trypsin](http://cs.wikipedia.org/wiki/Trypsin) a chymotrypsin) - hydrolyzují [bílkoviny](http://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADlkoviny) na oligopeptidy, případně až na [aminokyseliny](http://cs.wikipedia.org/wiki/Aminokyseliny)

Souhrnně je nazývána směs těchto enzymů pankreatická šťáva, která je odváděna systémem vývodů ze slinivky do [dvanáctníku](http://cs.wikipedia.org/wiki/Dvan%C3%A1ctn%C3%ADk). Zde se setkávají s [tráveninou](http://cs.wikipedia.org/wiki/Tr%C3%A1venina) předzpracovanou v [žaludku](http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%BDaludek) a podílejí se na jejím dalším [trávení](http://cs.wikipedia.org/wiki/Tr%C3%A1ven%C3%AD).

V úloze bude používána suspenze Pancreatinu (extrakt vepřového pankreatu) nebo sliny jako zdroj trávicích enzymů a bude sledována jejich aktivita za různých podmínek.

Aktivitu amylasy lze sledovat jednak jako úbytek substrátu (škrobu) – např. detekcí škrobu Lugolovým roztokem, jednak jako přírůstek produktu (maltosy), např. reakcí maltosy s Fehlingovým činidlem.

Aktivitu lipasy lze sledovat nejsnáze jako přírůstek jednoho z produktů – mastných kyselin, které mění (snižují) pH reakčního prostředí. (Okyselení reakčního prostředí zaznamená vhodný acidobazický indikátor, v této úloze fenolová červeň.)

Aktivita proteas bude v této úloze sledována jako úbytek substrátu (bílkoviny) pomocí biuretové reakce.

### B) Bakteriální enzymy denitrifikační dráhy

Prokaryotní organismy syntetizují nepřeberné množství enzymů, které se u vyšších organismů nevyskytují. Patří k nim například enzymy nitrátové respirace produkované denitrifikačními bakteriemi - nitrátreduktasa, nitritreduktasa, reduktasy oxidů dusíku (konečným produktem nitrátové respirace je volný dusík). Tyto enzymy jsou obvykle syntetizovány za anaerobních podmínek kultivace bakterií.

V úloze bude používána suspenze anaerobně kultivovaných bakterií Paracoccus denitrificans a sledováno působení enzymů nitrátreduktasy (redukuje dusičnany na dusitany) a nitritreduktasy (redukuje dusitany na oxidy dusíku – oxid dusnatý a oxid dusný). Rovněž bude sledován vliv antimycinu A na aktivitu nitritreduktasy.

K nejsnáze detekovatelným meziproduktům denitrifikace patří dusitanový anion tvořící v kyselém prostředí s řadou vhodných činidel barevné kopulační produkty. V této úloze bude k detekci dusitanu používán sulfanilamid a N-(1-naftyl)-ethylendiamin dihydrochlorid (NED), v jejichž přítomnosti poskytuje dusitan výrazné fialovočervené zbarvení.

PRAKTICKÁ ČÁST

### A) Trávicí enzymy pankreatické šťávy, slinná amylasa

**Materiál a vybavení:**

suspenze Pancreatinu (2 % vodný roztok)

60 mmol.1-1  Tris-Cl pufr s přídavkem 30 mmol.1-1  chloridu vápenatého, pH 8,2

1 % roztok škrobu

1 % roztok želatiny

plnotučné nebo polotučné mléko

Lugolův roztok

Fehlingovo činidlo I (roztok síranu měďnatého)

Fehlingovo činidlo II (roztok vínanu sodno-draselného v hydroxidu sodném)

0,1 % roztok fenolové červeně ve 20 % etanolu

10 % hydroxid sodný

1 % síran měďnatý

0,2 mol.1-1  uhličitan sodný

5 mol.1-1  kyselina chlorovodíková

5 mol.1-1  hydroxid sodný

*zkumavky, pipety, dávkova*č*e,kahan a trojnožka nebo vařič, hrnec, držák na zkumavky nebo kruhový stojan na zkumavky, ledová láze*ň*, kádinky, Pasteurovy pipety, vortex, termostat, stopky*

## EXPERIMENT 1 – alfa-amylasová reakce

Do zkumavek A a B pipetujte 1 ml Tris-pufru a 1 ml roztoku škrobu, promíchejte.

Z obou zkumavek odeberte po 0,5 ml vzorku a přidejte k němu 10 - 20 µl Lugolova roztoku (odběr v čase 0 minut). Do tabulky zaznamenejte zbarvení vzorků po přidání Lugolova roztoku.

Obě zkumavky obsahující pufr a škrob vložte do termostatu temperovaného na 37 °C, temperujte je přibližně 5 minut. Pak do zkumavky A pipetujte 1 ml vlastních slin, do zkumavky B pipetujte 1 ml destilované vody, obsah zkumavek promíchejte a zkumavky vraťte do termostatu. Po 60 minutách (zkumavky občas promíchejte a vraťte do termostatu) odeberte z obou zkumavek po 0,5 ml vzorku a přidejte k němu 10 - 20 µl Lugolova roztoku (odběr v čase 60 minut). Do tabulky zaznamenejte zbarvení vzorků po přidání Lugolova roztoku.

Ze zkumavek A a B nakonec odeberte po 0.5 ml vzorku, přidejte 0,5 ml Fehlingova činidla I a 0,5 ml Fehlingova činidla II. Opatrně povařte na vodní lázni a pozorujte, ve které zkumavce je reakce pozitivní.

Zaznamenejte zbarvení vzorků (pro lepší sledování vybarvení můžete vzorky nakapat na skleněnou desku položenou na filtračním papíře, kapky vzorků případně ještě zřeďte přikápnutím vody):

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| čas (min.) | 0  zbarvení vzorku po přidání Lugolova roztoku | 60  zbarvení vzorku po přidání Lugolova roztoku | 60  zbarvení vzorku po Fehlingově reakci |
| zkumavka  A |  |  |  |
| zkumavka  B |  |  |  |

Odpovězte:

Pozitivní reakce (tmavé – černé, tmavomodré až tmavohnědé zbarvení) s Lugolovým roztokem dokazuje přítomnost

……………………………………

Pozitivní reakce (hnědočervené zbarvení) s Fehlingovým činidlem dokazuje přítomnost

……………………………………

Amylasová reakce probíhala ve zkumavce …….., důvod:………………………………………………………..

Substrátem alfa-amylasy je …………….……..……………………………………..….………....

Jedná se látku (vysokomolekulární – nízkomolekulární)………………………...………

Produktem alfa-amylasové reakce je/jsou …………………………………………………….

Jedná se látku/látky (vysokomolekulární – nízkomolekulární)……….….……………

Alfa-amylasa patří do kategorie (skupiny) enzymů………………………………….………

***EXPERIMENT 2 – lipasová reakce***

Ke 20 ml mléka přidejte 10 kapek roztoku fenolové červeně a mléko opatrně zneutralizujte

0,2 mol.1-1 uhličitanem sodným (asi 1 ml – nepředávkovat!) do růžového zbarvení.

Do dvou zkumavek A a B napipetujte po 5 ml neutralizovaného mléka. (Tyto zkumavky budou sloužit jako referenční vzorky pro sledování pro změny zbarvení vzorku, v němž bude probíhat enzymová reakce.) Do zkumavky B přidejte 0,2 ml 5 mol.1-1  kyseliny chlorovodíkové, promíchejte (vzniká žluté zbarvení).

Do zkumavek C, D a E pipetujte 2 ml neutralizovaného mléka.

Zkumavku C inkubujte cca 5 minut v termostatu temperovaném na 37 oC.

Zkumavku D vložte na cca 5 minut do ledové lázně.

Zkumavku E vložte do horké vody (která prošla varem – cca 80 oC).

Do zkumavek C, D, a E přidejte 1 ml suspenze Pancreatinu, obsah zkumavek

promíchejte a vraťte je do termostatu, resp. ledové nebo horké lázně.

Pozorujte změnu zbarvení (mléko občas promíchejte a srovnávejte jeho zbarvení s referenčními vzorky) cca 30 – 60 minut.

Odpovězte:

Změna zbarvení neutralizovaného mléka (růžová → žlutá) dokazuje přítomnost

………………………………..

Ve zkumavce C se zbarvení změnilo – nezměnilo …………………. důvod: ………………….……………

Ve zkumavce D se zbarvení změnilo – nezměnilo …………………. důvod: ………………….……………

Ve zkumavce E se zbarvení změnilo – nezměnilo …………………. důvod: ……………………..…………

Substrátem lipasy je …………………..……………………….……………………………………...

Jedná se látku (vysokomolekulární – nízkomolekulární)…………………….…………

Produktem lipasové reakce je/jsou ……………………………………………………………….

Jedná se látku/látky (vysokomolekulární – nízkomolekulární)……….………………

Lipasa patří do kategorie (skupiny) enzymů………………………….…………………..……

## EXPERIMENT 3 – proteasová reakce

Do každé ze čtyř zkumavek A až D napipetujte 2,5 ml Tris-pufru a 2 ml roztoku želatiny.

Do zkumavky A přidejte 0,5 ml destilované vody, do zkumavky B 0,5 ml 5 mol.1-1  kyseliny chlorovodíkové, do zkumavky C 0,5 ml 5 mol.1-1  hydroxidu sodného.

Do těchto tří zkumavek A až C zkumavek přidejte 1 ml suspenze Pancreatinu, obsah zkumavek promíchejte a inkubujte je cca 60 minut v termostatu temperovaném na 37 oC.

Do zkumavky D pipetujte 1,5 ml destilované vody, rovněž ji inkubujte cca 60 minut při teplotě 37 oC.

Biuretová reakce: Po uplynutí cca 60 minut odeberte z každé zkumavky 1 ml vzorku do čistých zkumavek A´ až D´, ke vzorkům přidejte 1 ml roztoku 10 % NaOH, přidejte několik kapek roztoku síranu měďnatého (jeho nadbytek vadí, neboť vzniklý hydroxid měďnatý překrývá svým zbarvením zbarvení měďnatého komplexu bílkoviny) a promíchejte.

Pozorujte rozdíly ve zbarvení jednotlivých vzorků zejména proti kontrolnímu vzorku ve zkumavce D´. Rozdíly zbarvení vyniknou při pohledu do zkumavek shora, proti bílému pozadí (filtrační papír).

Jestliže nejsou rozdíly ve zbarvení pozorovatelné, temperujte původní zkumavky A až D obsahující reakční směs dalších cca 60 minut a znovu proveďte biuretovou reakci.

Odpovězte:

Pozitivní biuretová reakce (fialové zbarvení) dokazuje přítomnost

………………………………..

Zbarvení vzorku ve zkumavce A´…………………. důvod: ………………….……………

Zbarvení vzorku ve zkumavce B´…………………. důvod: ………………….……………

Zbarvení vzorku ve zkumavce C´…………………. důvod: ……………………..…………

Zbarvení vzorku ve zkumavce D´…………………. důvod: ……………………..…………

Substrátem proteas je …………………..……………………….………………………..……....

Jedná se látku (vysokomolekulární – nízkomolekulární)…………………..…………

Produktem proteasové reakce je/jsou ……………………………………………………….

Jedná se látku/látky (vysokomolekulární – nízkomolekulární)………….…………

Proteasy patří do kategorie (skupiny) enzymů………………………….…………………

A) Bakteriální enzymy denitrifikační dráhy

**Materiál a vybavení:**

suspenze anaerobně kultivovaných buněk *P. denitrificans*

0,2 mol.1-1  fosfátový pufr, pH 7

0,2 mol.1-1  jantaran sodný (pH 7)

100 mmol.1-1  dusičnan sodný

10 mmol.1-1  dusitan sodný

1 % sulfanilamidd v HCl

0,1 % NED (N-(1-naftyl)-ethylendiamin dihydrochlorid)

antimycin A, roztok 1 mg/ml ethanolu

*zkumavky, pipety, dávkova*č*e, odměrné zkumavky – objem 10 ml, stopky*

## EXPERIMENT 4 – nitrátreduktasová a nitritreduktasová reakce

Ve zkumavkách A, B, C a D s objemem 5 ml smíchejte vždy 2,55 ml fosfátového pufru, 1,25 ml roztoku jantaranu a 1,125 ml vody. Přidejte 0,125 ml suspenze bakterií *P. denitrificans*, obsah zkumavek promíchejte obrácením na zátku (tak, aby se zbytečně neprokysličoval). Zkumavky nechejte stát 20 – 30 minut při laboratorní teplotě.

Nachystejte si čtyři sady po 13 zkumavkách obsahujících 0,1 ml roztoku sulfanilamidu.

Do zkumavky A přidejte 0,2 ml 10 mmol.1-1  roztoku **dusitanu** sodného a obsah zkumavky opatrně promíchejte převrácením na zátku.

Do zkumavky B přidejte 0,2 ml 10 mmol.1-1  roztoku **dusitanu** sodného, 10 µl roztoku antimycinu A a obsah zkumavky opatrně promíchejte převrácením na zátku.

Do zkumavky C přidejte 0,2 ml 100 mmol.1-1  roztoku **dusičnanu** sodného a obsah zkumavky opatrně promíchejte převrácením na zátku.

Do zkumavky D přidejte 0,2 ml 100 mmol.1-1  roztoku **dusičnanu** sodného, 10 µl roztoku antimycinu A a obsah zkumavky opatrně promíchejte převrácením na zátku.

Z každé zkumavky A, B, C a D **ihned** **po promíchání** (je nutná spolupráce dvou osob) odeberte 0,2 ml vzorku a přeneste jej do zkumavek obsahujících roztok sulfonamidu (odběr v čase 0). (Optimální je pracovat se čtyřmi dávkovači - pokud nejsou k dispozici, vyměňujte na jednom dávkovači čtyři označené špičky.) Po cca 4 minutách přidejte ke vzorkům po 0,1 ml roztoku NED.

Další vzorky ze zkumavek A až D odebírejte v intervalu 5 minut (viz tabulka). Po cca 4 minutách (tedy chvíli před dalším odběrem vzorků ze zkumavek A až D) přidejte ke dříve odebraným vzorkům obsahujícím sulfanilamid po 0,1 ml roztoku NED.

Pozorujte vznik červenofialového zbarvení (zbarvení se vyvíjí cca 5 - 10 minut).

Zaznamenejte zbarvení vzorků cca 5 - 10 minut po přidání NED:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| čas | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 |
| zkumavka A |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| zkumavka B |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| zkumavka C |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| zkumavka D |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Odpovězte:

Pozitivní reakce (červené zbarvení) dokazuje přítomnost

………………………………..

Sledování aktivity nitritreduktasy:

popište děj ve zkumavce A\*: …………………………………………………………………………………….

popište děj ve zkumavce B\*: …………………………………………………………………………………….

Zdůvodněte rozdíl (popište vliv antimycinu A na aktivitu nitritreduktasy): ………………………………………………………………………………………………………………………………..

Sledování společného průběhu nitrátreduktasové a nitritreduktasové reakce:

popište děj ve zkumavce C\*: …………………………………………………………………………………….

popište děj ve zkumavce D\*: …………………………………………………………………………………….

Zdůvodněte rozdíl (popište vliv antimycinu A – pro interpretaci výsledků dějů ve zkumavkách C a D využijte poznatek získaný sledováním dějů ve zkumavkách A a B): ………………………………………………………………………………………………………………………………..

\*Popisujte skutečně děje v inkubačních zkumavkách A,B,C,D (nikoliv změny zbarvení v detekčních zkumavkách), buďto slovně nebo pomocí chemických rovnic.

Napište společné schéma nitrátreduktasové a nitrireduktasové reakce, vyznačte místo působení antimycinu A: …………………………………

Substrátem nitrátreduktasy je …………………..……………………….……………………………....

Jedná se látku (vysokomolekulární – nízkomolekulární)…………………………

Produktem nitrátreduktasové reakce je/jsou ……………………………………………………………….

Jedná se látku/látky (vysokomolekulární – nízkomolekulární)……….………………

Nitrátreduktasa patří do kategorie (skupiny) enzymů………………………….……

Substrátem nitritreduktasy je …………………..……………………….……………………………....

Jedná se látku (vysokomolekulární – nízkomolekulární)…………………………

Produktem nitritreduktasové reakce je/jsou ……………………………………………………………….

Jedná se látku/látky (vysokomolekulární – nízkomolekulární)……….………………

Nitritreduktasa patří do kategorie (skupiny) enzymů………………………….………