

jméno:		1
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 aktivitou**. Enzymy určují povahu i rychlost chemických reakcí a řídí většinu biochemických procesů.

Základní složkou enzymů jsou proteiny, na něž se velmi často vážou další přídatné molekuly - kofaktory nebo prostetické skupiny, které se podílí na katalýze. Samotná enzymatická reakce probíhá obvykle v tzv. **aktivním místě** 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 a přítomnosti aktivátorů a inhibitorů.

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: katalyzují oxidačně/redukční reakce
- EC 2 – transferázy: přenášejí funkční skupiny
- EC 3 – hydrolázy: katalyzují hydrolýzu chemických vazeb
- EC 4 – lyázy: štěpí chemické vazby jiným způsobem než hydrolýzou či redoxní reakcí
- EC 5 – izomerázy: katalyzují isomerizační reakce
- EC 6 – ligázy: 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 trávicí soustavy. V slinivce se produkuje řada enzymů, z nichž nejdůležitější jsou:

- **amylasy** – hydrolyzují polysacharidy, nejvýznamnější je alfa-amylasa štěpící škrob na maltosu (stejně účinky má slinná amylasa)
- **lipasy** – hydrolyzují tuky na glycerol a mastné kyseliny
- **proteasy** (především trypsin a chymotrypsin) - hydrolyzují bílkoviny na oligopeptidy, případně až na aminokyseliny

Souhrnně je nazývána směs těchto enzymů pankreatická šťáva, která je odváděna systémem vývodů ze slinivky do dvanáctníku. Zde se setkávají s tráveninou předzpracovanou v žaludku a podílejí se na jejím dalším trávení.

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 nejnázem 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 nejnázem 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.l⁻¹ Tris-Cl pufr s přísávkem 30 mmol.l⁻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 vlnanu sodno-draselného v hydroxidu sodném)

0,1 % roztok fenolové červeně ve 20 % etanolu

10 % hydroxid sodný

1 % síran měďnatý

0,2 mol.l⁻¹ uhličitan sodný

5 mol.l⁻¹ kyselina chlorovodíková

5 mol.l⁻¹ hydroxid sodný

zkumavky, pipety, dávkovače, kahan a trojnožka nebo vaříč, hrnec, držák na zkumavky nebo kruhový stojan na zkumavky, ledová lázeň, 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 zředte přikápnutím vody):

čas (min.)	0	60	60
	zbarvení vzorku po přidání Lugolova roztoku	zbarvení vzorku po přidání Lugolova roztoku	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.l⁻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.l⁻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 °C.

Zkumavku D vložte na cca 5 minut do ledové lázně.

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

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-pufry a 2 ml roztoku želatiny.

Do zkumavky A přidejte 0,5 ml destilované vody, do zkumavky B 0,5 ml $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové, do zkumavky C 0,5 ml $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 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 $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Do zkumavky D pipetujte 1,5 ml destilované vody, rovněž ji inkubujte cca 60 minut při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

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.l⁻¹ fosfátový pufr, pH 7

0,2 mol.l⁻¹ jantaran sodný (pH 7)

100 mmol.l⁻¹ dusičnan sodný

10 mmol.l⁻¹ dusitan sodný

1 % sulfanilamid v HCl

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

antimycin A, roztok 1 mg/ml ethanolu

zkumavky, pipety, dávkovače, odměrné zkumavky – objem 10 ml, stopky

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 nitritreduktasové 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.....