

jména:	
obor:	

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Oxidačně-redukční reakce. Donory a akceptory elektronů. Respirační řetězce mitochondrií a bakterií.

PRINCIP ÚLOHY

Mezi procesy v živých systémech zaujímají významné místo **oxidačně-redukční (redoxní) reakce**, při kterých se mezi reaktanty přenášejí elektrony (obecněji tzv. „redukční ekvivalenty“). **Donor** je ztrácí, tj. oxiduje se, zatímco **akceptor** je přijímá, tj. je redukován. Některé redoxní reakce probíhají značnou rychlostí spontánně (např. přeměny volných radikálů), většina ovšem vyžaduje katalýzu specifickými enzymy z třídy oxidoreduktas. Tak například cytoplazmatický enzym laktátdehydrogenasa (laktát:NAD⁺-oxidoreduktasa, EC 1.1.1.27) při nedostatku kyslíku v pracujícím svalu redukuje pyruvát (akceptor) na L-laktát (redukováný akceptor); NADH (donor) přitom přechází na NAD⁺ (oxidovaný donor). V játrech probíhá obrácená reakce mezi L-laktátem (zde donor) a NAD⁺ (zde akceptor).

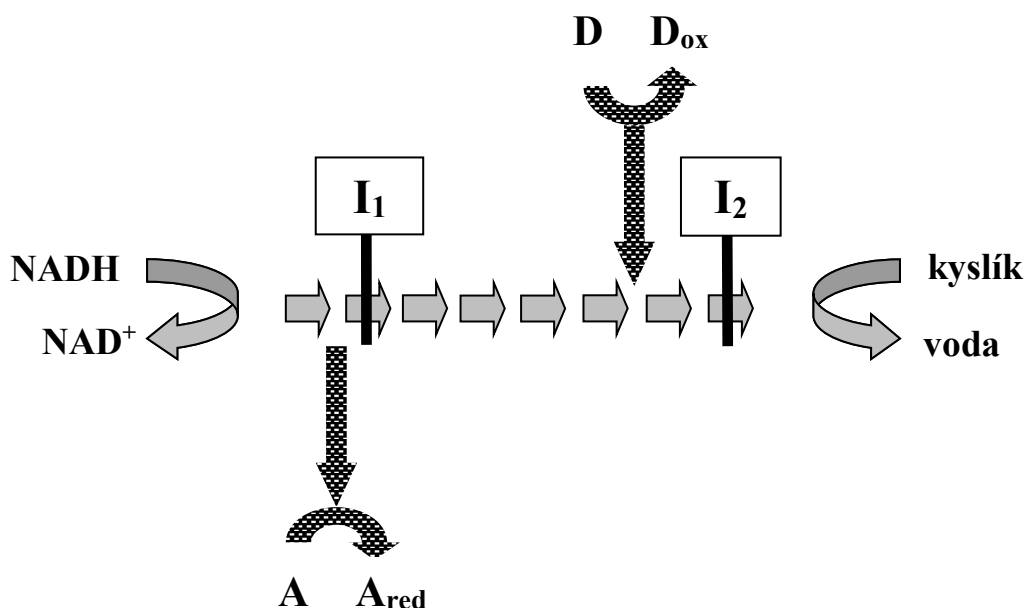
Oxidoreduktasy známe jak rozpustné, tak i **vázané na biologické membrány**. Některé membránové oxidoreduktasy mohou vzájemně spolupracovat tím, že produkt předchozího enzymu (redukováný akceptor) zastává funkci donoru pro enzym následující. Funkční seskupení enzymů a elektronových přenašečů, které uskutečňuje sérii následných redoxních reakcí vázaných na biologickou membránu, nazýváme **řetězec přenosu elektronu** (angl. electron transfer chain).

Krátké řetězce přenosu elektronu typicky nacházíme v endoplasmatickém retikulu, kde se uplatňují při syntéze nenasyčených mastných kyselin, steroidních hormonů a transformacích cizorodých látek. Z hlediska energetiky buňky mají zásadní význam dlouhé řetězce obsažené v **membránách přeměňujících energii** (vnitřní mitochondriální membrána, cytoplazmatická membrána bakterií, membrána tylakoidu chloroplastu). Přenos redukčních ekvivalentů se v nich uskutečňuje napříč lipidovou dvojvrstvou a je spojen se vznikem transmembránových rozdílů elektrického potenciálu a pH. Ty spolu tvoří tzv. „**protonový gradient**“, formu energie využitelnou k tvorbě adenosintrifosfátu (ATP) z adenosindifosfátu (ADP) a fosfátu (Pi).

Vstupním donorem mitochondriálního řetězce přenosu elektronu bývá NADH (oxiduje se na NAD⁺) nebo sukcinát (oxiduje se na fumarát) a konečným (terminálním) akceptorem je kyslík (redukuje se na vodu). Protože se zde spotřebovává vdechovaný kyslík, hovoříme o mitochondriálním **respiračním řetězci** (respirace = dýchání). U bakterií může být kyslík nahrazen jiným terminálním akceptorem, např. dusičnanem nebo síranem (**anaerobní respirace**). V chloroplastu se při tzv. světelné fázi fotosyntézy oxiduje voda na kyslík a NADP⁺ se redukuje na NADPH. Elektrony zde tedy tečou „obráceně“ než při respiraci. Aby to bylo energeticky možné, obsahuje zde přítomný řetězec dva fotosystémy (fotosystém I a II), schopné využívat k pohonu redoxních reakcí energie slunečního záření (fotosyntetický přenos elektronu).

Oproti rozpustným enzymům mají membránové respirační a fotosyntetické řetězce značně složitější stavbu. Pro jejich snazší studium se proto někdy nejdříve rozdělují na menší součásti například pomocí solubilizace neiontovými detergenty a následné chromatografie. Separace funkční využívá umělých donorů a akceptorů, kombinovaných případně se specifickými inhibitory. **Umělý donor** je nefyziologická redoxaktivní látka, která dodává elektrony definované složce elektrontransportního řetězce; **umělý akceptor** naproti tomu z určitého místa řetězce elektrony odebírá. Protože oxidovaná a redukováná forma těchto látek se liší svými absorpčními spektry, lze jejich vzájemné přeměny sledovat jako změny absorbance. **Inhibitor** se váže na některou oxidoreduktasu řetězce a brání průběhu jí katalyzované reakce.

Metodu funkční separace u respiračního řetězce si budeme ilustrovat pomocí následujícího schématu:

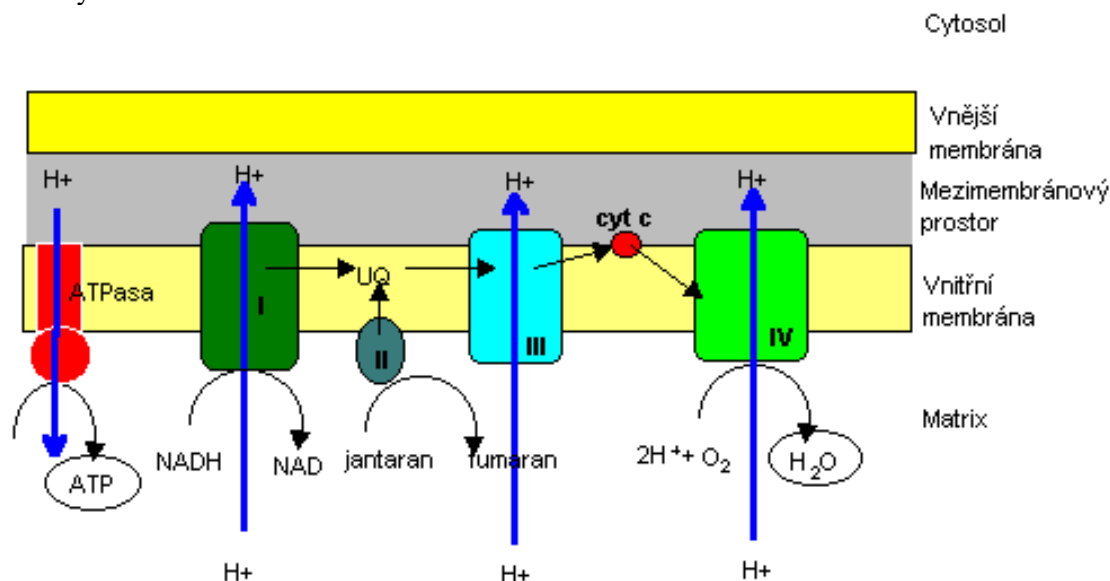


Respirační inhibitory I₁ i I₂ blokují přenos elektronů ze sukcinátu na kyslík, nebrání však redukci umělého akceptoru A sukcinátem. Enzymová oxidace umělého donoru D kyslíkem je inhibována I₂, ale nikoli I₁. Měřením vlivu inhibitorů na jednotlivé reakce tedy můžeme získat **relativní pořadí míst interakce donorů, akceptorů (A) a inhibitorů (I) s řetězcem** (v uvedeném schématu A, I₁, D, I₂).

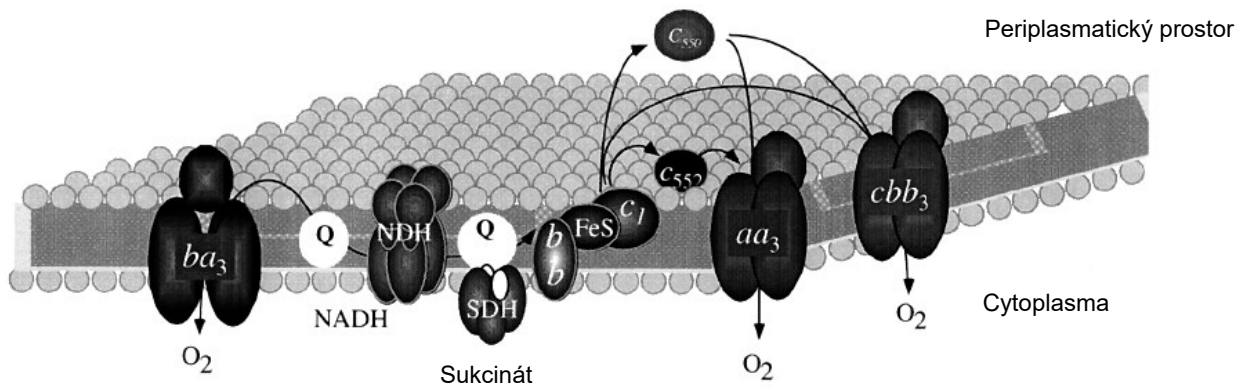
CÍL PRÁCE

Inhibitory respiračního řetězce bakterie *Paracoccus denitrificans*

Cytoplazmatická membrána aerobně rostlé půdní bakterie *P. denitrificans* obsahuje respirační řetězec, který se podobá respiračnímu řetězci mitochondrií. Přenos elektronů z NADH na kyslík může být inhibován kyanidem, malonátem a antimycinem. Místa zásahu uvedených inhibitorů a zda skutečně inhibují budete v úloze analyzovat s využitím redoxaktivních látek 2,6-dichlorfenolindofenolu (DCIP) a N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiaminu (TMPD). Před vlastními experimenty s biologickým materiálem si u DCIP a TMPD jednoduchými chemickými zkouškami ukážete existenci redoxních přechodů, jež jsou provázeny barevnými změnami.



Obrázek 1: Respirační řetězec na membráně mitochondrií



Obrázek 2: Respirační řetězec na membráně bakterie *Paracoccus denitrificans*

Srovnání – komplex I = NDH (NADH dehydrogenáza), komplex II = SDH (sukcinát dehydrogenáza), komplex III = bc1 komplex s FeS klastrem, cyt c = cyt c550 nebo cyt c552, komplex IV = aa3 komplex (cyt c oxidáza), bakterie má navíc cbb3 komplex a ba3 komplex jako alternativní terminální elektronové akceptory, jantaran = sukcinát

PRAKTICKÁ ČÁST. Inhibitory respiračního řetězce bakterie *Paracoccus denitrificans*

Materiál a vybavení:

membrány z buněk *Paracoccus denitrificans* (cca 1-5 mg proteinu/ml)
 10 mmol.l⁻¹ DCIP
 0,1 mol.l⁻¹ TMPD
 kyselina askorbová - krystalky
 peroxidisíran amonný - krystalky
 50 mmol.l⁻¹ Tris-Cl (pH = 7,3)
 50 mmol.l⁻¹ sukcinát sodný
 0,1 mol.l⁻¹ kyselina malonová
 1,0 mg.ml⁻¹ roztok antimycinu (v ethanolu!)
 0,1 mol.l⁻¹ kyanid sodný
 mikrotitrační destička, mikropipety, špachtlička, stopky, jehla na míchání

Upozornění: umělohmotné špičky k mikropipetám vyměňujte za nové tak, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorku – např. jinými inhibitory.

Pokud máte směs v jamce mikrotitrační destičky zamíchat, proveďte míchání buď špičkou z mikropipety, kterou jste použili jako poslední nebo jehlou. Míchejte jen jednou, a to bezprostředně po napipetování posledního z roztoků! Později nemíchat!

Dodržujte bezpečnostní zásady při práci s chemikáliemi, jsou toxické!

Postup:

EXPERIMENT 1

0,1M roztok TMPD připravte přidávkem 1 ml vody do mikrozkušavky s navážkou pevného TMPD (Mr = 164,25). TMPD se oxiduje vzdušným kyslíkem na Wursterovu modř. Jestliže je roztok TMPD, který jste připravili, zbarven modře, přidejte k němu malý krystalek kyseliny askorbové a promíchejte – dojde k odbarvení roztoku. **V experimentech (1 a 2) používejte bezbarvý 0,1 mol.l⁻¹ roztok TMPD.**

V jamkách mikrotitrační destičky proveďte následující reakce – dávkujte podle tabulky:

oxidační činidlo – peroxidisíran amonný, krystalky

redukční činidlo – kyselina askorbová, krystalky

jamka č.	20 mmol.l ⁻¹ DCIP	H ₂ O		pozorování
1	20 μl	180 μl	2-3 krystalky oxidačního činidla	modrá →
2	20 μl	180 μl	2-3 krystalky redukčního činidla	modrá →

jamka č.	0,1 mol.l ⁻¹ TMPD	H ₂ O		pozorování
3	20 μl	180 μl	2-3 krystalky oxidačního činidla	bezbarvá →
4	20 μl	180 μl	2-3 krystalky redukčního činidla	bezbarvá →

Vyhodnocení:

Na základě svých pozorování (alespoň 5 minut) vyberte správné varianty:

DCIP

oxidovaná forma: BEZBARVÁ/BAREVNÁ, elektronový DONOR/AKCEPTOR

redukována forma: BEZBARVÁ/BAREVNÁ, elektronový DONOR/AKCEPTOR

TMPD

oxidovaná forma: BEZBARVÁ/BAREVNÁ, elektronový DONOR/AKCEPTOR

redukována forma: BEZBARVÁ/BAREVNÁ, elektronový DONOR/AKCEPTOR

Výsledky pokusu znázorněte pomocí šipek:

**EXPERIMENT 2**

Dávkujte do mikrotitrační destičky jak je uvedeno v jednotlivých řádcích tabulky - rychle, bez časových prodlev. TMPD přidejte do jamek č. 1-4 jamek až budete mít napipetovány roztoky ve všech řádcích, jak je uvedeno v tabulce. Ihned po přidání TMPD směs zamíchejte (jehlou). Po přidání TMPD do poslední jamky zapněte stopky.

jamka č.	membrány	Inhibitor		50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl	0,1 mol.l ⁻¹ TMPD	Voda
1	10 μl	-	bez inhibitoru	190 μl	5 μl	50 μl
2	10 μl	10 ul	NaCN (0,1 mol.l ⁻¹)	190 μl	5 μl	40 μl
3	10 μl	5 ul	kys. malonová (0,1 mol.l ⁻¹)	190 μl	5 μl	45 μl
4	10 μl	5 ul	antimycin (1,0 mg.ml ⁻¹)	190 μl	5 μl	45 μl

Sledujte časový průběh barevných změn v jednotlivých jamkách a svoje pozorování запиšte:

jamka č. 1: bezbarvá →

jamka č. 2: bezbarvá →

jamka č. 3: bezbarvá →

jamka č. 4: bezbarvá →

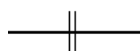
Vyhodnocení:

TMPD působí jako elektronový **DONOR/AKCEPTOR**

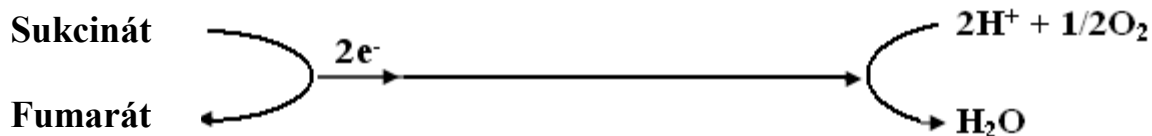
Před místem napojení TMPD inhibuje **KYANID – MALONÁT – ANTIMYCN**

Za místem napojení TMPD inhibuje **KYANID – MALONÁT – ANTIMYCN**

Místo napojení TMPD na respirační řetězec a místa zásahu inhibitorů schematicky zaznamenejte:



inhibitor



EXPERIMENT 3

Dávkujte do mikrotitrační destičky, jak je uvedeno v jednotlivých řádcích tabulky - rychle, bez časových prodlev. DCIP přidejte do jamek č. 1-3 jamek až budete mít napipetovány roztoky ve všech řádcích, jak je uvedeno v tabulce. Ihned po přidání DCIP směs zamíchejte (jehlou). Po přidání DCIP do poslední jamky zapněte stopky.

jamka č.	membrány	50 mmol.l ⁻¹ sukcinát sodný	Inhibitor		50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl	10 mmol.l ⁻¹ DCIP	Voda
1	10 μl	5 μl	-	bez inhibitoru	190 μl	5 μl	45 μl
2	10 μl	5 μl	10 ul	NaCN (0,1 mol.l ⁻¹)	190 μl	5 μl	35 μl
3	10 μl	5 μl	5 ul	kys. malonová (0,1 mol.l ⁻¹)	190 μl	5 μl	40 μl

Sledujte časový průběh (cca 10 minut) barevných změn v jednotlivých jamkách a svoje pozorování запиšte:

jamka č. 1: modrá →

jamka č. 2: modrá →

jamka č. 3: modrá →

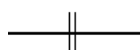
Vyhodnocení:

DCIP působí jako elektronový **DONOR/AKCEPTOR**

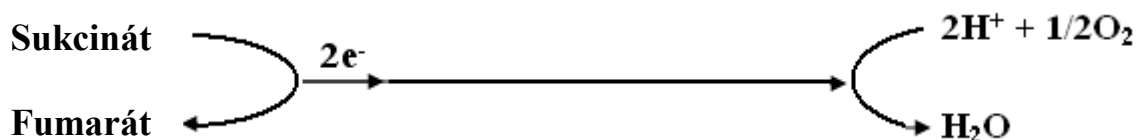
Před místem napojení DCIP inhibuje **KYANID – MALONÁT**

Za místem napojení DCIP inhibuje **KYANID – MALONÁT**

Místo napojení DCIP na respirační řetězec a místa zásahu inhibitorů schematicky zaznamenejte:



inhibitor



EXPERIMENT 4

Jestliže je roztok $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ TMPD, který máte k dispozici, bezbarvý, připravte si z něj Wursterovu modř tak, že $200 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ TMPD zředíte ve zkumavce $200 \mu\text{l}$ destilované vody a přidáte několik krystalků peroxidisíranu sodného (viz experiment 1). Jestliže má tmavé zbarvení, není potřeba jej upravovat (Wursterova modř vznikla oxidací TMPD vzdušným kyslíkem). Pak dávkujte do mikrotitrační destičky, jak je uvedeno v jednotlivých řádcích tabulky – rychle, bez časových prodlev. Wurstrovu modř přidejte do jamek č. 1-3 až budete mít napipetovány roztoky ve všech řádcích, jak je uvedeno v tabulce. Ihned po přidání Wurstrovu modři směs zamíchejte (jehlou). Po přidání Wurstrovu modři do poslední jamky zapněte stopky.

jamka č.	membrány	50 mmol.l^{-1} sukcinát sodný	Inhibitor		50 mmol.l^{-1} Tris-Cl	Wursterova modř	Voda
1	$10 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	-	bez inhibitoru	$190 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	$45 \mu\text{l}$
2	$10 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	$10 \mu\text{l}$	NaCN ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)	$190 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	$35 \mu\text{l}$
3	$10 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	kys. malonová ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$)	$190 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	$40 \mu\text{l}$

Sledujte časový průběh (přibližně 10 minut) barevných změn v jednotlivých jamkách a svá pozorování запиšte:

jamka č. 1: modrá →

jamka č. 2: modrá →

jamka č. 3: modrá →

Vyhodnocení:

Wursterova modř působí jako elektronový **DONOR/AKCEPTOR**

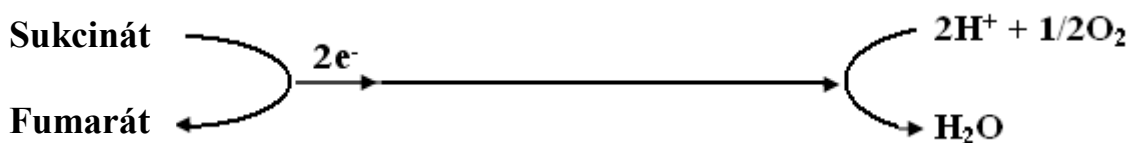
Před místem napojení Wursterova modř inhibuje **KYANID – MALONÁT**

Za místem napojení Wursterova modř inhibuje **KYANID – MALONÁT**

Místo napojení Wurstrovu modři na respirační řetězec a místa zásahu inhibitorů schematicky zaznamenejte:



inhibitor



EXPERIMENT 5

Jestliže je roztok **0,02 mol.l⁻¹ DCIP**, který máte k dispozici, modrý, připravte si z něj redukovaný DCIP tak, že 150 μl **0,02 mol.l⁻¹ DCIP** zředíte ve zkumavce 100 μl **0,02 mol.l⁻¹ kyseliny askorbové**. Jestliže je roztok po smíchání oranžový nebo se úplně odbarví, není potřeba jej upravovat. Potom dávkujte do mikrotitrační destičky jak je uvedeno v jednotlivých řádcích tabulky - rychle, bez časových prodlev. Redukovaný **DCIP** přidejte do jamek č. 1-3 jamek až budete mít napipetovány roztoky ve všech řádcích, jak je uvedeno v tabulce. Ihned po přidání redukovaného **DCIP** směs zamíchejte (jehlou). Po přidání redukovaného **DCIP** do poslední jamky zapněte stopky.

jamka č.	membrány	Inhibitor		50 mmol.l ⁻¹ Tris-Cl	10 mmol.l ⁻¹ red. DCIP	Voda
1	10 μl	-	bez inhibitoru	190 μl	5 μl	50 μl
2	10 μl	10 μl	NaCN (0,1 mol.l ⁻¹)	190 μl	5 μl	40 μl
3	10 μl	5 μl	kys. malonová (0,1 mol.l ⁻¹)	190 μl	5 μl	45 μl

Sledujte časový průběh (max. 10 minut) barevných změn v jednotlivých jamkách a svoje pozorování запиšte:

jamka č. 1: bezbarvá →

jamka č. 2: bezbarvá →

jamka č. 3: bezbarvá →

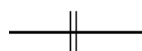
Vyhodnocení:

Redukovaný DCIP působí jako elektronový DONOR/AKCEPTOR

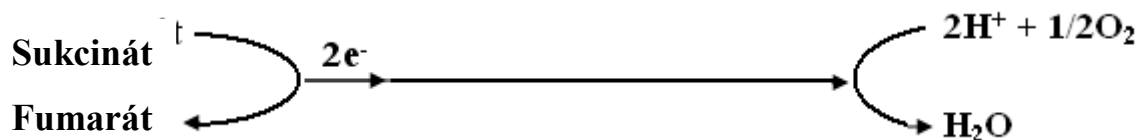
Před místem napojení redukovaného DCIP inhibuje KYANID – MALONÁT

Za místem napojení redukovaného DCIP inhibuje KYANID – MALONÁT

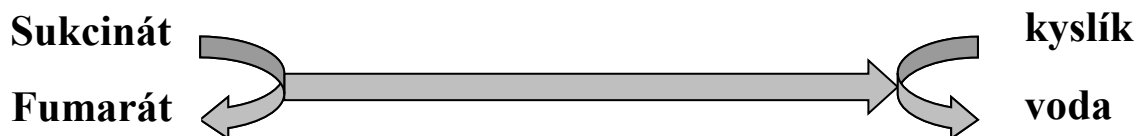
Místo napojení redukovaného DCIP na respirační řetězec a místa zásahu inhibitorů schematicky zaznamenejte:



inhibitor



Do následujícího závěrečného schématu respiračního řetězce zakreslete ve správném pořadí místa napojení DCIP, TMPD, Wursterovy modři a redukováného DCIP a místa inhibice kyanidem, malonátem a antimycinem.



V dalším obrázku se pokuste zakreslit konkrétní místa napojení DCIP a TMPD a místa zásahu inhibitorů (malonát, antimycin, kyanid).

