

# Spektrofotometrické stanovení standardního redoxního potenciálu cytochromu *c*

## TEORETICKÁ ČÁST

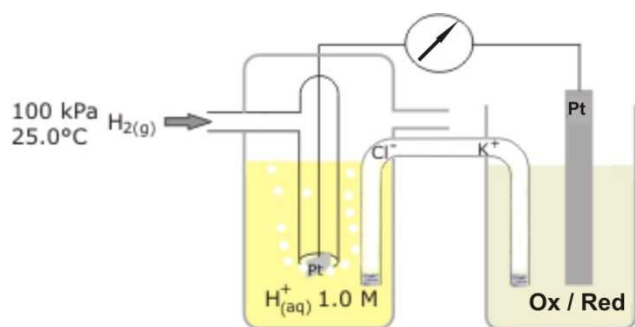
### Redoxní potenciál

V biochemii hrají významnou roli oxidačně-redukční (redoxní) reakce, spojené s přenosem elektronů mezi redoxními páry. Reakci redoxního páru 1 ( $Ox_1/Red_1$ ) s redoxním párem 2 ( $Ox_2/Red_2$ ) lze schematicky psát jako:



O termodynamicky možném směru toku elektronů rozhodují aktuální hodnoty tzv. redoxních potenciálů  $E$  obou párů. Při průběhu reakce (1) zleva doprava je  $E_1 > E_2$  a pro opačný směr  $E_1 < E_2$ . Jinak řečeno, akceptorový pár má vyšší redoxní potenciál než pár donorový; elektron se mezi redoxními páry přesouvá ve směru vzrůstu redoxního potenciálu. Nachází-li se reakce (1) v rovnováze, platí  $E_1 = E_2$ .

Redoxní potenciál  $E$  je definován jako rozdíl elektrického potenciálu (tj. napětí) mezi inertní sběrnou elektrodou, která v rovnováze s danými koncentracemi  $[Ox]$  a  $[Red]$ , a standardní vodíkovou elektrodou, obsahující standardní koncentrace redoxního páru  $2H^+/H_2$  (obr. 1).



**Obr. 1.** Měření redoxního potenciálu  $E$  pomocí standardní vodíkové elektrody. Využívá se voltmetru s vysokým vnitřním odporem, aby byl zajištěn bezproudový stav. Roztoky v obou částech jsou vodivě spojeny solným můstkem. Pro  $[Ox]=[Red]=1$  dostaneme standardní redoxní potenciál  $E^0$ . V praxi se obtížně realizovatelná vodíková elektroda nahrazuje jinými referenčními elektrodami se známým potenciálem.

Vztah mezi  $E$  a poměrem  $[Ox]/[Red]$  vyjadřuje Nernstova rovnice

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (2)$$

Obsahuje dva základní parametry:  $E^0$ , standardní redoxní potenciál, a  $n$ , počet elektronů potřebných k redukci  $Ox$  na  $Red$ . Změříme-li hodnoty poměru  $[Ox]/[Red]$  při různých hodnotách  $E$  a sestojíme-li graf závislosti  $E$  na  $\ln([Ox]/[Red])$ , dostaneme podle (2) přímkou se směrnici  $RT/nF$  (z níž lze určit  $n$ ) a s

úsekem na svislé ose rovným  $E^0$ . Jsou-li v roztoku v rovnováze dva redoxní páry, z rovnosti  $E_1 = E_2$  plyne

$$E_1^0 + \frac{RT}{n_1 F} \ln \frac{[Ox_1]}{[Red_1]} = E_2^0 + \frac{RT}{n_2 F} \ln \frac{[Ox_2]}{[Red_2]}$$

a po úpravě

$$\ln \frac{[Ox_1]}{[Red_1]} = \frac{n_1}{n_2} \ln \frac{[Ox_2]}{[Red_2]} + \frac{n_1 F}{RT} (E_2^0 - E_1^0) \quad (3)$$

Závislost  $\ln([Ox_1]/[Red_1])$  na  $\ln([Ox_2]/[Red_2])$  má tedy podobu přímky se směrnici  $n_1/n_2$  a úsekem  $(n_1 F/RT)(E_2^0 - E_1^0)$ . Známe-li hodnoty  $E_2^0$  a  $n_2$ , můžeme určit  $E_1^0$  a  $n_1$ .

### **Spektrofotometrické stanovení poměrů $[Ox]/[Red]$**

U mnohých biochemicky významných redoxaktivních látek lze aktuální poměry  $[Ox]/[Red]$  zjišťovat spektrofotometricky. Základním předpokladem je, že obě redoxní formy rozdílnou měrou absorbují elektromagnetické záření. Je-li v roztoku pouze jedna absorbující redoxaktivní látka, podle Lambertova-Beerova zákona při vlnové délce  $\lambda$  pro její absorpční  $A(\lambda)$  platí

$$A(\lambda) = \varepsilon_{ox}(\lambda) \cdot d \cdot [Ox] + \varepsilon_{red}(\lambda) \cdot d \cdot [Red] \quad (4)$$

kde  $\varepsilon_{ox}(\lambda)$  a  $\varepsilon_{red}(\lambda)$  jsou molární dekadické absorpční koeficienty oxidované a redukované formy (závislé na  $\lambda$ ) a  $d$  délka optické dráhy v roztoku. Celková (analytická) koncentrace  $c$  redoxaktivní látky se při redoxní reakci nemění a je rovna součtu koncentrací obou forem, tedy

$$c = [Ox] + [Red] \quad (5)$$

Je-li látka úplně oxidována (tj.  $[Red]=0$ ) resp. redukována (tj.  $[Ox]=0$ ), dostáváme absorbance  $A_{ox}(\lambda) = \varepsilon_{ox}(\lambda) \cdot d \cdot c$  resp.  $A_{red}(\lambda) = \varepsilon_{red}(\lambda) \cdot d \cdot c$ . Po jejich zavedení namísto absorpčních koeficientů vztah (4) přechází na tvar (6):

$$A(\lambda) = A_{ox}(\lambda) \frac{[Ox]}{c} + A_{red}(\lambda) \frac{[Red]}{c} \quad (6)$$

Podíly  $[Ox]/c$  a  $[Red]/c$  jsou zřejmě molové zlomky  $x_{ox}$  a  $x_{red}$  oxidované a redukované formy; jejich součet se podle (5) rovná 1. Při respektování této relace lze z (6) odvodit

$$x_{ox} = \frac{[Ox]}{c} = \frac{A_{red}(\lambda) - A(\lambda)}{A_{red}(\lambda) - A_{ox}(\lambda)} \quad (7)$$

$$x_{red} = \frac{[Red]}{c} = \frac{A(\lambda) - A_{ox}(\lambda)}{A_{red}(\lambda) - A_{ox}(\lambda)}$$

a konečně též

$$\frac{[Ox]}{[Red]} = \frac{x_{ox} \cdot c}{x_{red} \cdot c} = \frac{x_{ox}}{x_{red}} = \frac{A_{red}(\lambda) - A(\lambda)}{A(\lambda) - A_{ox}(\lambda)} \quad (8)$$

Známe-li tedy absorbance plně oxidovaného a plně redukováného vzorku při vlnové délce  $\lambda$ , můžeme po změření  $A(\lambda)$  vypočítat dosažením do vztahu (8) aktuální podíl koncentrace oxidované a redukované formy. Není přitom ani nutná znalost celkové koncentrace  $c$ .

Jak se změní situace, jestliže se v roztoku nacházejí dva absorbující redoxní páry,  $Ox_1/Red_1$  a  $Ox_2/Red_2$ ? Místo vztahu (4) teď máme jeho rozšíření na čtyři komponenty

$$A(\lambda) = \varepsilon_{ox1}(\lambda) \cdot d \cdot [Ox_1] + \varepsilon_{red1}(\lambda) \cdot d \cdot [Red_1] + \varepsilon_{ox2}(\lambda) \cdot d \cdot [Ox_2] + \varepsilon_{red2}(\lambda) \cdot d \cdot [Red_2]$$

jedna látková bilance (5) je nahrazena dvěma bilancemi (9)

$$c_1 = [Ox_1] + [Red_1] \quad c_2 = [Ox_2] + [Red_2] \quad (9)$$

a (6) dostává následující podobu

$$A(\lambda) = A_{ox1}(\lambda) \frac{[Ox_1]}{c_1} + A_{red1}(\lambda) \frac{[Red_1]}{c_1} + A_{ox2}(\lambda) \frac{[Ox_2]}{c_2} + A_{red2}(\lambda) \frac{[Red_2]}{c_2} \quad (10)$$

Je důležité si uvědomit, co přesně znamenají absorbance na pravé straně vztahu (10). Například  $A_{ox1}(\lambda)$  získáme pro zcela oxidovaný vzorek, který obsahuje pouze redoxní pár 1 v koncentraci  $c_1$ ; redoxní pár 2 není přítomen. Analýza směsi dvou redoxních párů podle (10) tudíž vyžaduje, abychom měli k dispozici i data pro separátní oxidované a redukované standardy: 1)  $[Ox_1] = c_1$  a  $c_2 = 0$ ; 2)  $[Ox_2] = c_2$  a  $c_1 = 0$ ; 3)  $[Red_1] = c_1$  a  $c_2 = 0$ ; 4)  $[Red_2] = c_2$  a  $c_1 = 0$ .

V případě jednoho redoxního páru v zásadě stačila jedna rovnice (6) spolu s látkovou bilancí (5) k charakterizaci redoxního stavu systému. Naproti tomu zde jedna rovnice (10) nestačí, protože ze čtyř obsažených molových zlomků  $x_{ox1} = [Ox_1]/c_1$ ,  $x_{red1} = [Red_1]/c_1$ ,  $x_{ox2} = [Ox_2]/c_2$  a  $x_{red2} = [Red_2]/c_2$  jsou v důsledku (9) nezávislé dva. Východisko spočívá ve využití dat získaných při více vlnových délkách ( $\lambda_1, \dots, \lambda_k$ ). Místo (10) pak máme soustavu  $k$  lineárních rovnic o čtyřech neznámých molových zlomcích redoxních forem

$$\begin{pmatrix} A_{ox1}(\lambda_1) & A_{red1}(\lambda_1) & A_{ox2}(\lambda_1) & A_{red2}(\lambda_1) \\ \bullet & \bullet & \bullet & \bullet \\ \bullet & \bullet & \bullet & \bullet \\ A_{ox1}(\lambda_k) & A_{red1}(\lambda_k) & A_{ox2}(\lambda_k) & A_{red2}(\lambda_k) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x_{ox1} \\ x_{red1} \\ x_{ox2} \\ x_{red2} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A(\lambda_1) \\ \bullet \\ \bullet \\ A(\lambda_k) \end{pmatrix} \quad (11)$$

nebo ve zkráceném zápisu

$$\mathbf{A} \mathbf{x} = \mathbf{a} \quad (11')$$

$\mathbf{A}$  je matice typu  $4 \times k$ , obsahující absorbance standardů,  $\mathbf{x}$  je čtyřrozměrný vektor molových zlomků a  $\mathbf{a}$  je  $k$ -rozměrný vektor absorbancí směsi. Pro  $k > 4$  (více rovnic než neznámých) jde o tzv. přeurčenou soustavu, která obecně nemá řešení. Můžeme však hledat vektor  $\mathbf{x}$  takový, aby velikost vektoru  $\mathbf{A} \mathbf{x} - \mathbf{a}$  nabyla minimální hodnoty. V české verzi Excelu lze k tomuto účelu použít maticové funkce

LINREGRESE(pole\_y;[pole\_x];[b];[stat])

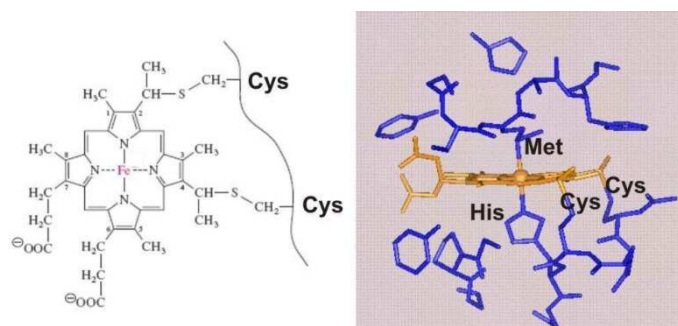
kde pole\_y je svislá oblast obsahující složky vektoru **a**, pole\_x je oblast obsahující prvky matice **A**; pro argumenty b a stat se volí logická hodnota 0 (NEPRAVDA). Výsledný vektor **x** se nachází ve vodorovné oblasti, přičemž jeho složky jsou v buňkách umístěny v opačném pořadí, tedy ( $x_{red2}$ ,  $x_{ox2}$ ,  $x_{red1}$ ,  $x_{ox1}$ ). Do svislé podoby ho lze převést funkcí TRANSPOZICE. Ukázka výpočtu je na obr. 2.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1			Matice A						Vektor a	
2			(absorbance standardů)						(absorbance směsi)	
3			Ox1	Red1	Ox2	Red2				
4	λ (nm):	383	0.697	0.386	0.154	0.158			0.682	
5		458	0.25	0.039	0.131	0.121			0.277	
6		504	0.177	0.101	0.183	0.127			0.311	
7		535	0.249	0.122	0.232	0.123			0.395	
8		564	0.152	0.014	0.275	0.111			0.322	
9		603	0.069	-0.012	0.301	0.102			0.275	
10		636	0.055	-0.032	0.244	0.06			0.231	
11										
12										
13			Do buňky I17 vloženo						Vektor x	
14			=TRANSPOZICE(LINREGRESE(I4:I10;C\$4:\$F\$10;0;0))						(molové zlomky)	
15			vybrána oblast I17:I20							
16			F2							
17			CTRL+SHIFT+ENTER							
18							xred2	0.219134578		
19							xox2	0.779011474		
20							xred1	0.419463826		
21							xox1	0.527435934		

Obr. 2. Ukázka výpočtu molových zlomků redoxních forem z absorbancí standardů a směsi za použití Excelu.

### Cytochrom c

Cytochrom c studovaný v naší úloze se běžně izoluje z hovězího srdce. Tento malý ( $M_r = 12\ 400$ ) a dobře rozpustný protein je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem se 104 aminokyselinovými zbytky, který nese kovalentně vázaný hem (obr. 3).



Obr. 3. Vazba hemu na polypeptidový řetězec v cytochromu c. Hem je vázán kovalentně dvěma thioetherovými můstky, jež vznikly adicí thiolových skupin dvou zbytků cysteinu na vinyly v polohách 2 a 4 tetrapyrrolového kruhu. Kromě toho síra methioninu a dusík imidazolového kruhu histidinu vystupují jako další dva ligandy Fe hemu.

Cytochrom c se nachází v prostoru mezi vnitřní a vnější membránou mitochondrií, kde díky své schopnosti přecházet mezi oxidovanou a redukovanou formou působí jako přenašeč elektronů v respiračním řetězci. Pokud se z mitochondrie uvolní do cytoplasmy buňky, může se vázat na zde přítomný protein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1). To vede ke vzniku oligomerního apoptosomu, aktivaci prokaspasy 9 a dalších enzymů účastnících se apoptosy (programované

buněčné smrti). Přítomnost hemové skupiny způsobuje barevnost proteinu. Spektrum roztoku jeho redukované formy vykazuje ve viditelné oblasti tři hlavní absorpční pásy s maximy při vlnových délkách 416 nm ( $\gamma$ ; tzv. Soretův pás), 520 nm ( $\beta$ ) a 550 nm ( $\alpha$ ). Při oxidaci se spektrum mění zejména v oblasti vyšších vlnových délek.

## ***Používané metody***

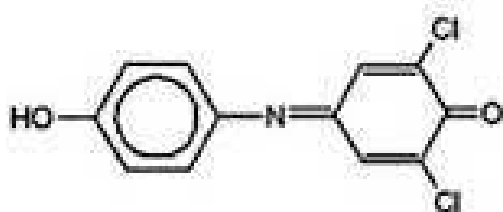
Standardní redoxní potenciál cytochromu *c* budeme stanovovat dvěma metodami. Obě využívají ekvibrace redoxního páru  $\text{cyt } c_{\text{ox}}/\text{cyt } c_{\text{red}}$  s druhým (pomocným) redoxním párem a platnosti vztahu (3).

### 1) Metoda redoxního pufru

Při tomto měření jako pomocný redoxní pár poslouží směs hexakynoželezitanu („ferrikyanidu“) a hexakynoželeznatanu („ferrokyanidu“). Jejich vzájemná přeměna probíhá jednoelektronově ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + e^- \leftrightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ), standardní redoxní potenciál je roven 0,43 V. Pokud jsou oba ionty přítomny ve výrazném stechiometrickém nadbytku vzhledem k cytochromu *c*, jejich koncentrace se během reakce s ním prakticky nezmění; podle Nernstovy rovnice (2) se nemění ani redoxní potenciál. Pár hexakynoželezitan/hexakynoželeznatan tedy působí jako redoxní pufr, který udržuje konstantní redoxní potenciál a „vnutí“ jej páru  $\text{cyt } c_{\text{ox}}/\text{cyt } c_{\text{red}}$ . (Srovnej analogické chování směsi báze s její protonovanou konjugovanou kyselinou, pufrující pH.) Abychom mohli aplikovat vztah (3), je zapotřebí pro několik známých výchozích poměrů  $[\text{hexakynoželezitan}]/[\text{hexakynoželeznatan}]$  (redoxní pár č. 2) stanovit odpovídající rovnovážné poměry  $[\text{cyt } c_{\text{ox}}]/[\text{cyt } c_{\text{red}}]$  (redoxní pár č. 1). Využijeme k tomu měření absorpance v oblasti maxima  $\alpha$  pásu (550 nm), neboť zde hexakynoželezitan ani hexakynoželeznatan významně neabsorbují. Poměry  $[\text{cyt } c_{\text{ox}}]/[\text{cyt } c_{\text{red}}]$  vypočteme pomocí vztahu (8).

### 2) Metoda redoxního indikátoru

Zde bude roztok kromě cytochromu *c* obsahovat redoxní indikátor 2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP) (obr. 4), jehož standardní redoxní potenciál má podle literatury hodnotu 0,217 V.



**Obr. 4.** Struktura 2,6-dichlorfenolindofenolu

Obě látky jsou redukovatelné enzymem xanthinoxidasou během katalytické konverze xanthinu na kyselinu močovou za anaerobních podmínek. Po nastartování enzymové reakce postupně klesá redoxní potenciál ve směsi, což se projevuje změnami poměrů koncentrací oxidovaných a redukovaných forem cytochromu *c* i DCIP. Analýzou opakovaně zaznamenávaných absorpčních spekter reakční směsi lze oba tyto poměry určit. Jak bylo zdůvodněno výše, potřebujeme k tomu spektra oxidovaných a redukovaných standardů, která změříme separátně.

## PRAKTICKÁ ČÁST

### 1) Metoda redoxního pufru

#### Přístroje:

Automatické pipety 2-20  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l, 1-5 ml

Spektrofotometr UV-VIS Ultrospec 2000

Voltmetr MT 100

#### Materiál:

Kádinka 50-100 ml

Referenční kalomelová elektroda

Pt elektroda

Plastové míchadlo

Plastové špičky

Spektrofotometrické plastové kyvety s objemem 3 ml

#### Chemikálie:

0,1 M  $K_4[Fe(CN)_6]$

0,1 M  $K_3[Fe(CN)_6]$

0,1 M  $Na_2S_2O_4$

0.5 mg/ml cytochromu c (cyt c) v 0,1 M sodno-fosfátovém pufru (pH 7,0)

0,1 M sodno-fosfátový pufr (pH 7,0)

#### Postup:

Připravíme 3 pracovní roztoky smícháním 2,7 ml roztoku cytochromu c s 0,3 ml roztoku 0,1 M  $K_4[Fe(CN)_6]$ , 0,1 M  $K_3[Fe(CN)_6]$  nebo 0,1 M  $Na_2S_2O_4$  ve 3 plastových spektrofotometrických kyvetách. Pracovní prostor spektrofotometru i roztoky necháme temperovat na teplotu 25 °C. K roztoku cytochromu c s  $K_4[Fe(CN)_6]$  budeme navíc postupně přidávat cyt c s  $K_3[Fe(CN)_6]$  jak je naznačeno ve vzorové tabulce. Měříme absorbance při 550 nm proti 0,1 M fosfátovému pufru, který bude sloužit jako slepý vzorek. Absorbance budou zaznamenávány do tabulky dle vzoru.

Roztoky	$A_{550}$	$\log([cyt\ c_{ox}]/[cyt\ c_{red}])$	$\log([K_3[Fe(CN)_6]],[K_4[Fe(CN)_6]])$
cyt c + $K_3[Fe(CN)_6]$ – kyveta 1			

cyt c + Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> – kyveta 2			
cyt c + K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] – kyveta 3			
+ 7,5 µl roztoku z kyvety 1			
+ 7,5 µl roztoku z kyvety 1			
+ 7,5 µl roztoku z kyvety 1			
+ 7,5 µl roztoku z kyvety 1			
+ 7,5 µl roztoku z kyvety 1			
+ 7,5 µl roztoku z kyvety 1			
+ 15 µl roztoku z kyvety 1			
+ 15 µl roztoku z kyvety 1			
+ 15 µl roztoku z kyvety 1			

Aktuální elektrochemické potenciály lze také měřit přímo s pomocí dvou elektrod. Pracovní platinová elektroda (kladný pól) a referenční kalomelová elektroda se vloží do roztoku 27 ml cyt c s 3 ml roztoku 0,1 M K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] a 7,5 µl 0,1 M K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] temperovaného v kádince na 25 °C. Po ustálení signálu zaznamenáme hodnotu elektrochemického napětí. Následně přidáváme roztok 0,1 M K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] jak je naznačeno ve vzorové tabulce a zaznamenáváme hodnoty potenciálu.

Roztoky	<i>E</i> (V)	log([K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]]/[K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]])
cyt c + K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] + 7,5 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		
+ 7,5 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		
+ 7,5 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		
+ 7,5 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		
+ 7,5 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		
+ 7,5 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		
+ 15 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		
+ 15 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		
+ 15 µl K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]		

Vyhodnocení:

Poměry  $[cyt\ c_{ox}]/[cyt\ c_{red}]$  vypočteme pomocí vztahu (8). Koncentrace, resp. poměry oxidované a redukované formy hexakynoželezitanu a hexakynoželeznatanu, jsou známy a lze je spočítat z koncentrací zásobních roztoků. Vyneseme graf závislosti  $\log([K_3[Fe(CN)_6]]/[K_4[Fe(CN)_6]])$  na  $\log([cyt\ c_{ox}]/[cyt\ c_{red}])$ , body proložíme lineární regresní přímkou a uvedeme v protokolu vedle grafu i rovnici této přímky. Úpravou rovnice 3 vypočítáme standardní redoxní potenciál redoxního páru  $cyt\ c_{ox}/cyt\ c_{red}$ , když je známo, že  $E_7^0 ([K_3[Fe(CN)_6]]/[K_4[Fe(CN)_6]]) = +0.43\ V$  a  $n = 1$ .

Vyneseme graf závislosti  $E$  na  $\log([K_3[Fe(CN)_6]]/[K_4[Fe(CN)_6]])$ , body proložíme lineární regresní přímkou a uvedeme v protokolu vedle grafu i rovnici této přímky. Úpravou rovnice 2 vypočítáme standardní redoxní potenciál páru hexakynoželezitan a hexakynoželeznatan a srovnáme s tabelovanou hodnotou.

Protokol:

Tabulka s naměřenými absorbancemi a vypočítanými dekadickými logaritmy poměru koncentrací oxidovaných a redukovaných komponent v reakční směsi.

Graf závislosti  $\log([K_3[Fe(CN)_6]]/[K_4[Fe(CN)_6]])$  na  $\log([cyt\ c_{ox}]/[cyt\ c_{red}])$ .

Výpočet standardního redoxního potenciálu  $cyt\ c$  a srovnání s tabelovanými hodnotami.

Tabulka s naměřenými elektrochemickými potenciály páru hexakynoželezitan/hexakynoželeznatan a vypočítané logaritmy poměru koncentrací tohoto redoxního páru.

Graf závislosti  $E$  na  $\log([K_3[Fe(CN)_6]]/[K_4[Fe(CN)_6]])$ .

Výpočet standardního redoxního potenciálu hexakynoželezitanu/hexakynoželeznatanu a srovnání s tabelovanými hodnotami.

2) Metoda redoxního indikátoruPřístroje:

Automatické pipety 2-20  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l, 1-5 ml

Hamiltonova jehla 1-5  $\mu$ l

Spektrofotometr UV-VIS Ultrospec 2000

Materiál:

Parafilm

Plastové špičky

Spektrofotometrické plastové kyvety s objemem 1 ml s gumovými zátkami

Chemikálie:



0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

0,01 M cyt c

0,01 M DCIP (dichlorfenol-indofenol, 2,6-dichlor-N-(4-hydroxyfenyl)-1,4-benzochinonimin)

0,01 M xantin – 17,4 mg xantinu rozpustíme v 0,1 ml 1M NaOH a následně přidáme 9,9 ml vody do výsledného objemu 10 ml

0,1 M sodno-fosfátový pufr (pH 7,0)

Xantinoxidáza (mléčná)

Argon v tlakové lahvi

#### Návod k měření a zaznamenání spekter:

1. Zapneme hlavní vypínač na počítači a spektrofotometru UV-VIS Ultrospec 2000.
2. V přihlašovací okně napíšeme win.
3. Správce programů → SWIFT Bio-ws → File → Open → Parameters → redoxit.ws1
4. Run → Standard → Samples = 10 ⇒ OK → File already exists! Overwright? ⇒ Ano → Load  
Reference ⇒ OK → Load sample 1 - 10 ⇒ OK v intervalu po 3 minutách
5. Post-Run → Data points (recorded spectrum 0-9), v případě standardů (recorded spectrum 0-

3)

#### Postup:

0,1 M sodno-fosfátový pufr (pH 7,0) a kyvetový prostor spektrofotometru temperujeme na 25 °C. Do kyvety o objemu 1 ml odměříme 888 µl 0,1 M sodno-fosfátový pufr (pH 7,0), 4 µl 0,01 M cyt c, 16 µl 0,01 M DCIP, 1 µl benzylviologenu a 90 µl 0,01 M xantinu. Horní vstup kyvety zavřeme gumovou zátkou a bubláme roztok argonem po dobu 10 minut. Zátku utěsníme parafilmem. Kyvetu s vytlačeným vzduchem přeneseme do kyvetového prostoru spektrometru, v kterém jsme napřed zaznamenali spektrum samotného pufru jako referenci. Následně zaznamenáme v čase 0 min spektrum číslo 1 roztoku v anaerobní kyvetě a redukci cyt c a DCIP nastartujeme přidáním 1 µl roztoku xantinoxidázy Hamiltonovou jehlou. Postupně v časových intervalech po 1 minutě zaznamenáme 9 dalších spekter. Odečteme absorbance pro minimálně 6 různých vhodně vybraných vlnových délek (např. 450, 535, 550, 565, 600, 635 nm).

Analýza směsi dvou redoxních párů vyžaduje, abychom měli k dispozici i data pro separátní oxidované a redukované standardy. Pro DCIP nebo cyt c odměříme do kyvety sodno-fosfátový pufr (pH 7,0) do výsledného objemu 1 ml, 90 µl 0,01 M xantinu, 4 µl 0,01 M cyt c nebo 16 µl 0,01 M DCIP a zaznamenáme spektra oxidovaných forem. Spektra redukovaných forem zaznamenáme v uspořádání sodno-fosfátový pufr (pH 7,0) do výsledného objemu 1 ml, 90 µl 0,01 M xantinu, 0,01 ml 0,1 M

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  a 4  $\mu\text{l}$  0,01 M cyt c nebo 16  $\mu\text{l}$  0,01 M DCIP. Odečteme absorbance pro minimálně 6 různých vhodně vybraných vlnových délek (např. 450, 535, 550, 565, 600, 635 nm).

#### Vyhodnocení:

Do tabulky uvedeme absorbance pro vybrané vlnové délky oxidované a redukované formy cyt c a DCIP, absorbance směsi, v které probíhala redoxní reakce a molové zlomky cyt c a DCIP vypočtené dle návodu v obr. 2 v programu Microsoft Excell. Dosazením do neupravené rovnice 3 vypočítáme standardní redoxní potenciál cyt c.  $E_7^0$  DCIP je +0,217 V pro dvouelektronový přenos ( $n = 2$ ).

#### Protokol:

Tabulka s naměřenými absorbancemi pro vybrané vlnové délky a vypočítanými molárními zlomky pro DCIP a cyt c.

Výpočet standardního redoxního potenciálu cyt c a srovnání s tabelovanými hodnotami a hodnotou získanou metodou redoxního pufu.