

jména:	
obor:	datum provedení:

přílohy protokolu: graf: extrapolace rychlosti fenoloxidasové reakce k nulovému času, graf: vliv kyanidu sodného a azidu sodného na rychlost vzniku TBQ fenoloxidasovou reakcí (závislost absorbance reakční směsi na čase), graf: vliv přirozeně se vyskytujících derivátů fenolu na rychlost vzniku TBQ fenoloxidasovou reakcí (závislost absorbance reakční směsi na čase)

OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Fenoloxidasová reakce, principy měření fenoloxidasové aktivity. Rychlost enzymové reakce, počáteční rychlost enzymové reakce, aktivita enzymu, jednotky enzymové aktivity, specifická aktivita enzymu, jednotky specifické aktivity. Inhibice enzymové reakce. Struktura derivátů fenolu. Chemické výpočty.

Návod v plném znění platí pro obory molekulární biologie, chemie, biochemie (pětihodinová a sedmihodinová cvičení).

Biologické obory kromě molekulární biologie (tříhodinová cvičení): části A, B, C.

Učitelské kombinace (čtyřhodinová cvičení): části A, B, D, E.

PRINCIP ÚLOHY

A. Příprava enzymového preparátu

Fenoloxidaso (1,2-benzendiol : O₂ – oxidoreduktasa), nazývaná též polyfenoloxidaso, fenolasa, monofenoloxidaso, difenoloxidaso nebo tyrosinasa, katalyzuje v přítomnosti molekulárního kyslíku hydroxylaci různých monofenolů na o-difenoly (tzv. kresolasová aktivita) a následnou oxidaci o-difenolů na odpovídající o-chinony (tzv. katecholasová aktivita). Fenoloxidaso se vyskytuje ve většině druhů ovoce a zeleniny, velké množství tohoto enzymu obsahují také brambory.

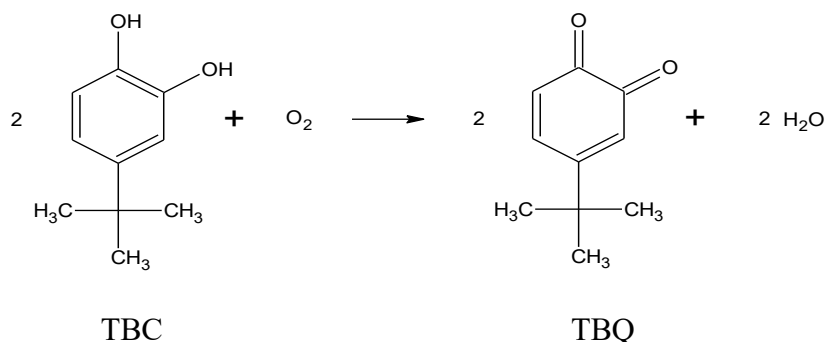
Fenoloxidaso rovněž katalyzuje přeměnu aminokyseliny tyrosinu (4-hydroxyfenylalanin) na 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA), který dále oxiduje molekulárním kyslíkem na dopachinon. Dopachinon se v několika krocích spontánně přeměňuje na indolchinon, který polymeruje za vzniku tmavě zbarveného melaninu, což se projevuje tmavnutím různého ovoce a zeleniny po jejich rozříznutí nebo jiném narušení jejich povrchu na vzduchu. DOPA může být (v živočišných buňkách) také dekarboxylován za vzniku dopaminu, který je prekurzorem biosyntézy adrenalinu a noradrenalinu.

Fenoloxidaso bývá z biologického materiálu izolována v inaktivní formě (jako tzv. proenzym); aktivaci lze provést pomocí detergentů nebo trypsinu, který hydrolyticky odštěpí část enzymové molekuly a tím zpřístupní její aktivní centrum.

B. Stanovení aktivity fenoloxidaso

Aktivitu fenoloxidaso lze stanovit **fotometricky**, neboť produkty fenoloxidasové reakce jsou barevné sloučeniny. Reakční produkty vzniklé fenoloxidasovou reakcí s přirozenými substráty však často polymerují, přičemž se v závislosti na stupni polymerace v čase mění vlnová délka jejich absorpčního maxima a hodnota absorpčního koeficientu. Aktivitu fenoloxidaso je tedy možné kvantitativně fotometricky stanovit pouze s umělými chromogenními substráty.

Jako umělé chromogenní substráty fenoloxidaso jsou nejčastěji používány 4-methylkatechol nebo terciární butylkatechol (TBC), které jsou fenoloxidasou oxidovány za vzniku 4-methyl-chinonu resp. terciárního butylchinonu (TBQ). Tyto chinony nepolymerují, absorbují viditelné záření s maximem v okolí vlnové délky 400 nm a jejich množství vzniklé fenoloxidasovou reakcí lze fotometricky stanovit ($\epsilon_{\text{TBQ}} = 10^4 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).



C. Substrátová specifita fenoloxidas

V této části úlohy bude studována **substrátová specifita** fenoloxidas. Budou použity deriváty fenolu a naftolu hydroxylované v různých polohách a jednoduchým vizuálním sledováním tmavnutí roztoků bude určeno, které deriváty jsou substráty fenoloxidas, popřípadě jak rychle s nimi reakce probíhá.

D. Důkaz přítomnosti kovu v aktivním centru fenoloxidas

Mnohé enzymy kyslíkového metabolismu obsahují v aktivním centru atom kovu, nejčastěji železa nebo mědi. Tyto enzymy jsou velmi silně inhibovány kyanidem, azidem, oxidem uhelnatým a dalšími látkami, které se vážou na centrální atom kovu a působí jako **nekompetitivní inhibitory** enzymu. Cílem této části úlohy bude zjistit, zda fenoloxidas obsahuje v aktivním centru atom kovu.

E. Inhibice fenoloxidas analogy substrátů

Látky strukturně podobné přirozenému nebo umělému substrátu mohou být buďto alternativními substráty enzymu anebo působit jako **kompetitivní inhibitory** enzymu, pokud je enzym nedokáže přeměnit na produkt. V tom případě zůstávají navázány v jeho aktivním centru a blokují jej - znemožňují vazbu molekulám substrátu. V této části úlohy bude zjišťováno, zda-li přirozeně se vyskytující analogy substrátů fenoloxidas kyselina skořicová, kyselina benzoová a fenylalanin působí jako její inhibitory.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Příprava enzymového preparátu

Materiál a vybavení:

brambor

0,2 mol.l⁻¹ fosfátový pufr pH 7,5

vychlazený 10 mmol.l⁻¹ fosfátový pufr pH 7,5

roztok trypsinu (100 x zředěný preparát používaný v úloze č. 8)

nůž, struhadlo, mísa, gáza, kádinka, ledová lázeň, filtrační papír, nálevka, odměrná zkumavka, velká zkumavka s uzávěrem, pipeta, dávkovač, termostat, odměrný válec, předvážky

Postup:

Oloupaný brambor zvažte s přesností na 0,1 g, nastrouhejte a šťávu vymačkejte přes hustou gázu do kádinky. Rychle odfiltrujte 10 ml šťávy do odměrné zkumavky umístěné v ledové lázni (při laboratorní teplotě fenoloxidasa oxiduje stopy tyrosinu přítomného v rostlinném materiálu, což se projevuje tmavnutím preparátu). K filtrátu přidejte 0,5 ml 0,2 mol.l⁻¹ fosfátového pufru pH 7,5 (neutrální pH udržuje fenoloxidasu v latentním stavu) a 50 µl roztoku trypsinu. Filtrát inkubujte 15 minut při teplotě 30 °C (ve vodním terostatu). 1 ml filtrátu zřeďte 10 x (tj. v poměru 1 : 9) 10 mmol.l⁻¹ vychlazeným fosfátovým puftrem, zbytek filtrátu ponechejte neředěný. Oba preparáty uložte do ledové lázně.

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte:

- hmotnost brambor (g):

- celkový objem vymačkané bramborové šťávy (filtrát + zbytek) (ml):

PRAKTICKÁ ČÁST B. Stanovení aktivity fenoloxidasy

Materiál a vybavení:

filtrát bramborové šťávy připravený v úloze 11a (ředěný i neředěný)

50 mmol.l⁻¹ octanový pufr pH 5,0

90 mmol.l⁻¹ TBC (čerstvě připravený roztok)

zkumavky, pipety, dávkovače, fotometr, temperovaná nádobka, vzduchovací motorek

Postup:

Příprava pracovního pufru: Smíchejte 10 ml 90 mmol.l⁻¹ roztoku TBC, 15 ml octanového pufru a 4 ml vody, směs (označte jako **směs B**) nalijte do temperované nádobky a nejméně po dobu 10 minut ji provzdušňujte pomocí vzduchovacího motorku.

Při všech experimentech používejte důkladně provzdušněnou vytemperovanou pracovní směs! Snížená koncentrace kyslíku v reakční směsi je limitujícím faktorem reakční rychlosti.

Stanovení počáteční rychlosti enzymové reakce: Do spektrofotometrické kyvety pipetujte 950 µl provzdušněné pracovní směsi. Kyvetu vložte do fotometru a hodnotu absorbance při vlnové délce 400 nm seřídte na nulu. Fenoloxidasovou reakci startujte přidávkem 50 µl zředěného filtrátu bramborové šťávy - důkladně promíchejte. Spusťte stopky a v intervalech 10 sekund odečítejte hodnoty absorbance vzorku při vlnové délce 400 nm po dobu 2 minut. Přírůstek absorbance by měl činit přibližně 0,2 za minutu – je-li vyšší nebo nižší, změňte vhodným způsobem ředění filtrátu. Měření nejméně dvakrát (v případě špatné reprodukovatelnosti výsledků i vícekrát) opakujte. **Do kontrolního listu запиšte, jaký objem filtrátu jste použili k měření a jaké bylo ředění použitého filtrátu.**

Proveďte korekci měření na přidavek enzymového preparátu do reakční směsi: Změřte absorbanci vzorku obsahujícího 950 µl octanového pufru a 50 µl použitého enzymového preparátu proti octanovému pufru při vlnové délce 400 nm.

doba reakce t [s]	A ₄₀₀	A ₄₀₀	A ₄₀₀
10			
20			
30			
40			
50			
60			
70			
80			
90			
100			
110			
120			

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulky doplněné experimentálními (A_{400}) a vypočtenými údaji (A_{400} korigovaná = \emptyset A_{400} - A_{400} korekčního vzorku).

Vypočtete reakční rychlosti v jednotlivých časových intervalech a extrapolaci k nulovému času (viz úloha 8) zjistěte počáteční rychlost fenoloxidasové reakce jako rychlost přírůstku produktu:

$$(\epsilon_{\text{TBQ}} = 10^4 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$$

- A_{400} korekčního vzorku:

- objem reakční směsi [ml]:

doba reakce t [s]	\emptyset A_{400}	A_{400} korigovaná	c(TBQ) [mmol/l]	n(TBQ) [nmol]	dn(TBQ) [nmol]	v [nkat]
10						
20						
30						
40						
50						
60						
70						
80						
90						
100						
110						
120						

Zjistěte **počáteční rychlost enzymové reakce** v_0 (extrapolací – jako rychlost přírůstku produktu) [nkat]:

- objem ředěného filtrátu v reakční směsi [ml]:

- objem neředěného filtrátu v reakční směsi [ml]:

- **specifická aktivita fenoloxidasy ve filtrátu** [nkat na 1 ml neředěného filtrátu]:

PRAKTICKÁ ČÁST C. Substrátová specifita fenoloxidasy

Materiál a vybavení:

neředěný filtrát bramborové šťávy připravený v úloze 11a
50 mmol.l⁻¹ octanový pufr pH 5,0
10 mmol.l⁻¹ roztoky derivátů fenolu (fenol, pyrokatechol, resorcinol, hydrochinon, 1-naftol, 2-naftol)
zkumavky, pipety, odměrný váleček nebo Pasteurova pipeta, termostat

Postup:

Do 6 zkumavek pipetujte 1,5 ml octanového pufru a dále přidejte podle rozpisu:

zkumavka č.	1 ml substrátu		zbarvení před přidáním enzymového preparátu	zbarvení po 15 min	zbarvení po 60 min
1	fenol	(<i>hydroxybenzen</i>)			
2	pyrokatechol	(<i>1,2-dihydroxybenzen</i>)			
3	resorcinol	(<i>1,3-dihydroxybenzen</i>)			
4	hydrochinon	(<i>1,4-dihydroxybenzen</i>)			
5	1-naftol	(<i>1-hydroxynaftalen</i>)			
6	2-naftol	(<i>2-hydroxynaftalen</i>)			

Roztoky fenolu a jeho derivátů nepipetujte - dávkujte pomocí odměrného válečku nebo Pasteurovy pipety!

Fenoloxidasovou reakci startujte přidávkem 0,5 ml **neředěného** filtrátu - důkladně promíchejte. Zkumavky umístěte do termostatu temperovaného na 30 °C, reakční směs občas promíchejte (přísun kyslíku do reakční směsi) a pozorujte vznik zbarvení ve zkumavkách, srovnajte po cca 15 a 60 minutách reakce.

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou experimentálními výsledky (zbarvení reakčních směsí). Popište substrátovou specifitu fenoloxidasy:

- fenoloxidasa oxiduje:

- fenoloxidasa neoxiduje:

- substrátová specifita fenoloxidasy:

PRAKTICKÁ ČÁST D. Důkaz přítomnosti kovu v aktivním centru fenoloxidasy

Materiál a vybavení:

filtrát bramborové šťávy připravený v úloze 11a

50 mmol.l⁻¹ octanový pufr pH 5,0

90 mmol.l⁻¹ TBC (čerstvý roztok)

0,1 mol.l⁻¹ kyanid sodný (čerstvý roztok)

0,1 mol.l⁻¹ azid sodný

zkumavky, pipety, dávkovače, fotometr, temperovaná nádobka, vzduchovací motorek

Postup:

Příprava pracovního pufru: Smíchejte 10 ml 90 mmol.l⁻¹ roztoku TBC, 15 ml octanového pufru a 1 ml vody, směs (označte jako **směs D**) nalijte do temperované nádobky (30 °C) a nejméně po dobu 10 minut ji provzdušňujte pomocí vzduchovacího motorku.

Při všech experimentech používejte důkladně provzdušněnou vytemperovanou pracovní směs! Snížená koncentrace kyslíku v reakční směsi je limitujícím faktorem reakční rychlosti.

Fotometrické stanovení aktivity fenoloxidasy: Do spektrofotometrické kyvety pipetujte 2,6 ml provzdušněné pracovní směsi a dále dle rozpisu:

zk. č.	0,3 ml	A ₄₀₀												
		t [s]	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
1	voda													
2	voda													
3	voda													
4	kyanid sodný													
5	kyanid sodný													
6	kyanid sodný													
7	azid sodný													
8	azid sodný													
9	azid sodný													

Kyanid sodný a azid sodný jsou látky silně toxické! Roztoky činidel pipetujte se zvýšenou opatrností, použijte bezpečnostní nástavec na pipety!

Kyvetu vložte do fotometru a hodnotu absorbance při vlnové délce 400 nm seřídte na nulu.

Fenoloxidasovou reakci startujte přidávkem 0,1 ml zředěného filtrátu bramborové šťávy (ředění viz úloha 11b) - důkladně promíchejte. Spusťte stopky a v intervalech 20 sekund odečítejte hodnoty absorbance vzorku při vlnové délce 400 nm po dobu 4 minut. Každé měření proveďte jedenkrát (bílé řádky), po konzultaci s vedoucím cvičení případně budete měření opakovat.

Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou experimentálními údaji (A_{400}) a do grafu vynesete závislosti A_{400} na době reakce pro jednotlivé reakční směsi (kontrolní vzorek a další vzorky obsahující různá činidla) – vyberte vždy jedno ze tří paralelních měření. Dále uveďte:

látka	inhibice fenoloxidasy*	předpokládaný typ inhibice**
kyanid sodný		
azid sodný		

*) + látka inhibuje fenoloxidasu

- látka neinhibuje fenoloxidasu

***) kompetitivní nebo nekompetitivní

Fenoloxidasa obsahuje - neobsahuje atom kovu:

PRAKTICKÁ ČÁST E. Inhibice fenoloxidasy analogy substrátů

Materiál a vybavení:

filtrát bramborové šťávy připravený v úloze 11a

50 mmol.l⁻¹ octanový pufr pH 5,0

15 mmol.l⁻¹ TBC (čerstvý roztok)

7,5 mmol.l⁻¹ kyselina benzoová (pH upraveno na hodnotu 5)

7,5 mmol.l⁻¹ kyselina skořicová (pH upraveno na hodnotu 5)

7,5 mmol.l⁻¹ fenylalanin

zkumavky, pipety, dávkovače, fotomet, temperovaná nádobka, vzduchovací motorek

Postup:

Příprava pracovního pufru: Smíchejte 5 ml 15 mmol.l⁻¹ roztoku TBC, 18 ml octanového pufru a 7,2 ml vody, směs (označte jako **směs E**) nalijte do temperované nádobky (30 °C) a nejméně po dobu 10 minut ji provzdušňujte pomocí vzduchovacího motorku.

Při všech experimentech použijte důkladně provzdušněnou vytemperovanou pracovní směs! Snížená koncentrace kyslíku v reakční směsi je limitujícím faktorem reakční rychlosti.

Fotometrické stanovení aktivity fenoloxidasy: Do spektrofotometrické kyvety pipetujte 2,5 ml provzdušněné pracovní směsi a dále dle rozpisu:

zk. č.	0,4 ml t [s]	A_{400}											
		20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
1	voda												
2	voda												
3	voda												
4	kys.skořicová												
5	kys.skořicová												
6	kys.skořicová												
7	kys.benzoová												
8	kys.benzoová												
9	kys.benzoová												
10	fenylalanin												
11	fenylalanin												
12	fenylalanin												

Kyvety vložte do fotometru a hodnotu absorbance při vlnové délce 400 nm seřídte na nulu. Fenoloxidasovou reakci startujte přidávkem 0,1 ml zředěného filtrátu bramborové šťávy (ředění viz úloha 11b) - důkladně promíchejte. Spustte stopky a v intervalech 20 sekund odečítejte hodnoty absorbance vzorku při vlnové délce 400 nm po dobu 4 minut. Každé měření proveďte jedenkrát (bílé řádky), po konzultaci s vedoucím cvičení případně budete měření opakovat.

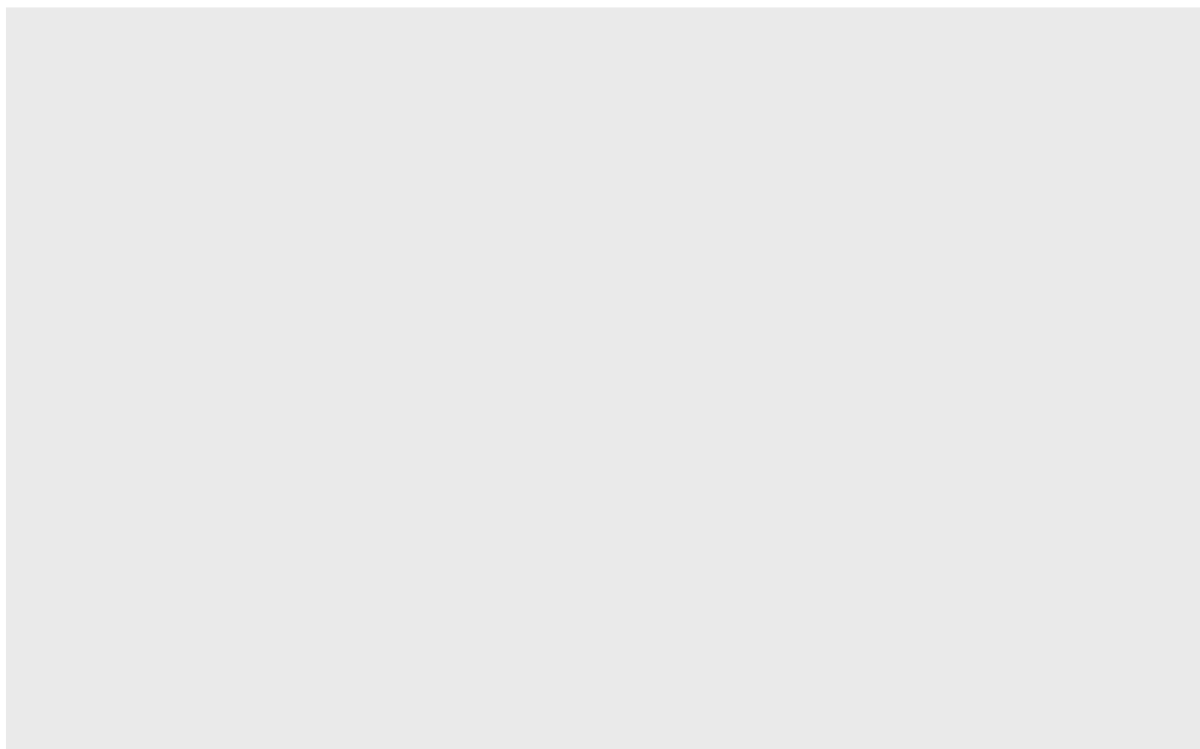
Vyhodnocení:

Do protokolu uveďte tabulku doplněnou experimentálními údaji (A_{400}) a do grafu vynesete závislosti A_{400} na době reakce pro jednotlivé reakční směsi (kontrolní vzorek a další vzorky obsahující různé přirozeně se vyskytující deriváty fenolu) – vyberte vždy jedno ze tří paralelních měření. Dále uveďte:

látka	inhibice fenoloxidasy*	předpokládaný typ inhibice**
kys. skořicová		
kys. benzoová		
fenylalanin		

- *) + látka inhibuje fenoloxidasu
 - látka neinhibuje fenoloxidasu
 **) kompetitivní nebo nekompetitivní

Srovnajte strukturu tyrosinu (přirozený substrát fenoloxidasy), kyseliny benzoové, kyseliny skořicové a fenylalaninu. Vysvětlete, proč jsou některé z derivátů fenolu inhibitory fenoloxidasy a jiné nikoliv:



KONTROLNÍ LIST

jméno:	
obor:	datum provedení:

ÚLOHA 11B

doba reakce t [s]	A ₄₀₀	A ₄₀₀	A ₄₀₀
10			
20			
30			
40			
50			
60			
70			
80			
90			
100			
110			
120			

- A₄₀₀ korekčního vzorku:

preparát **použitý k fotometrickému stanovení** aktivity fenoloxidasy:

- uved'te ředění filtrátu (kolikrát zředěný filtrát jste přidávali do kyvety):
- uved'te, kolik zředěného filtrátu jste přidávali do kyvety – objem:

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 11C

zkumavka č.	1 ml substrátu		zbarvení před přidáním enzymového preparátu	zbarvení po 15 min	zbarvení po 60 min
1	fenol	(<i>hydroxybenzen</i>)			
2	pyrokatechol	(<i>1,2-dihydroxybenzen</i>)			
3	resorcinol	(<i>1,3-dihydroxybenzen</i>)			
4	hydrochinon	(<i>1,4-dihydroxybenzen</i>)			
5	1-naftol	(<i>1-hydroxynaftalen</i>)			
6	2-naftol	(<i>2-hydroxynaftalen</i>)			

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 11D

zk. č.	0,3 ml	A_{400}											
		t [s]	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220
1	voda												
2	voda												
3	voda												
4	kyanid sodný												
5	kyanid sodný												
6	kyanid sodný												
7	azid sodný												
8	azid sodný												
9	azid sodný												

Podpis vedoucího cvičení:

ÚLOHA 11E

zk. č.	0,4 ml	A_{400}											
		t [s]	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220
1	voda												
2	voda												
3	voda												
4	kys.skořicová												
5	kys.skořicová												
6	kys.skořicová												
7	kys.benzoová												
8	kys.benzoová												
9	kys.benzoová												
10	fenylalanin												
11	fenylalanin												
12	fenylalanin												

Podpis vedoucího cvičení: