

Spektrofotometrické stanovení standardního redoxního potenciálu cytochromu *c*

TEORETICKÁ ČÁST

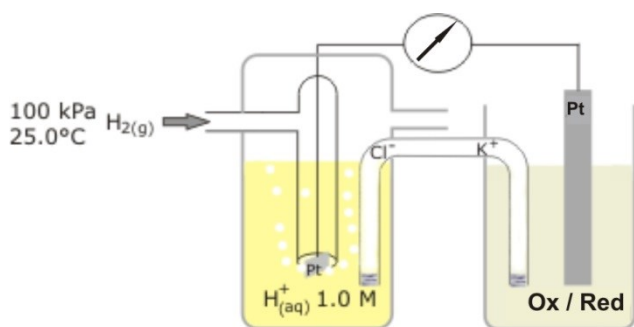
Redoxní potenciál

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 $[Ox]=[Red]$ 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

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

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 sestrojíme-li graf závislosti E na $\ln([Ox]/[Red])$, dostaneme podle (2) přímku se směrnicí RT/nF (z níž lze určit n) a s úsekem na svislé ose rovným E^0 . V biochemii se často užívá její zjednodušená forma s dekadickým logaritmem, definovaná pro 25 °C

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \log \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (2)$$

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:

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

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 . Zjednodušená rovnice pro 25 °C nabývá obdobně tvaru

$$\log \frac{[Ox_1]}{[Red_1]} = \frac{n_1}{n_2} \log \frac{[Ox_2]}{[Red_2]} + \frac{n_1}{0,0592} (E_2^0 - E_1^0) \quad (3)$$

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 λ 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 λ) 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

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

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 λ , můžeme po změření $A(\lambda)$ vypočítat dosazením 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 změření vzorku při více vlnových délkách ($\lambda_1, \dots, \lambda_k$). Místo (10) pak máme soustavu k lineárních rovnic o čtyřech neznámých molových zlomcích redoxních forem:

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

nebo ve zkráceném zápisu

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

\mathbf{A} je matice typu $k \times 4$, obsahující absorbance standardů, \mathbf{x} je čtyřrozměrný vektor molových zlomků a \mathbf{a} je k -rozměrný vektor absorbancí směsi. Pro $k > 4$ se jedná 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 \mathbf{a} , pole_x je oblast obsahující prvky matice \mathbf{A} ; pro argumenty b a stat se volí logická hodnota 0 (NEPRAVDA).

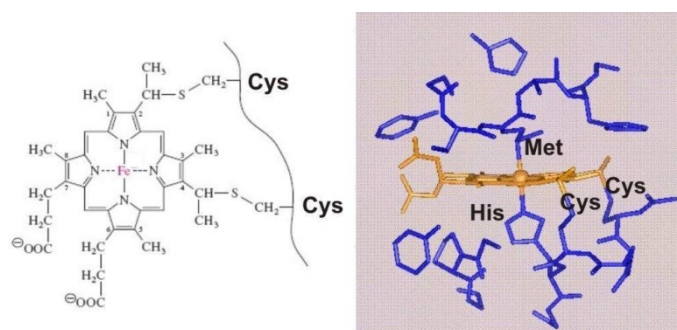
Výsledný vektor x se nachází ve vodorovné oblasti, přičemž jeho složky jsou v buňkách umístěny v opačném pořadí, tedy (x_{red2} , x_{ox2} , x_{red1} , x_{ox1}). Do svislé podoby ho lze převést funkcí TRANSPOZICE. Ukázka výpočtu je na obr. 2.

	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;ŠC\$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 vinylu 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 cytoplasmu 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 (γ ; tzv. Soretův pás), 520 nm (β) a 550 nm (α). Při oxidaci se spektrum mění zejména v oblasti vyšších vlnových délek.

Používané metody

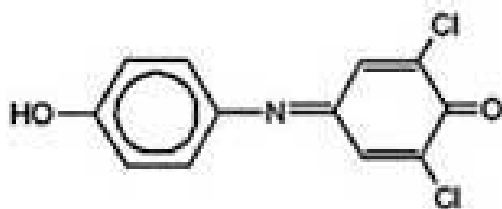
Samotný standardní redoxní potenciál cytochromu *c* budeme stanovovat dvěma metodami. Obě využívají ekvibrace redoxního páru c_{ox}/c_{red} s druhým (pomocným) redoxním párem a platnosti vztahu (3).

1) Metoda redoxního pufru

Při tomto měření poslouží jako pomocný redoxní pár směs hexakynoželezitanu („ferrikyanidu“) a hexakynoželeznatanu („ferrokyanidu“). Jejich vzájemná přeměna probíhá jedoelektronově ($Fe(CN)_6^{3-} + e^- \leftrightarrow Fe(CN)_6^{4-}$), standardní redoxní potenciál je roven 0,430 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 c_{ox}/c_{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 $[hexakynoželezitan]/[hexakynoželeznatan]$ (redoxní pár č. 2) stanovit odpovídající rovnovážné poměry $[c_{ox}]/[c_{red}]$ (redoxní pár č. 1). Využijeme k tomu měření absorbance v oblasti maxima α pásu (550 nm), neboť zde ferrikyanid ani ferrokyanid významně neabsorbují. Poměry $[c_{ox}]/[c_{red}]$ 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 a redukce obou látek postupně klesá redoxní potenciál ve směsi, což se projevuje změnami poměrů koncentrací oxidovaných a redukováných 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 redukováných standardů, která změříme separátně.

PRAKTICKÁ ČÁST

1) Potenciometrické ověření platnosti Nerstovy rovnice

Přístroje:

Automatické pipety 1-10 μl , 5-20 μl , 100-1000 μl , 1000-5000 μl , pipetovací špičky
Voltmetr MT 100

Materiál:

Kádinky 5ml, 100ml
Termostatovaná 40ml kádinka
Pt elektroda
Referenční kalomelová/AgCl elektroda
Magnetické míchadlo

Chemikálie:

5 ml 0,1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
5 ml 0,1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
100 ml 0,1 M sodno-fosfátového pufru (pH 7,0)

Postup:

Do kádinky temperované na 25 °C napipetujeme 27 ml fosfátového pufru, 3 ml roztoku 0,1 M $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 7,5 μl 0,1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Do roztoku ponoříme pracovní platinovou elektrodu a referenční elektrodu. Po ustálení signálu zaznamenáme hodnotu elektrochemického napětí. Následně přidáváme roztok 0,1 M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ jak je naznačeno ve vzorové tabulce a zaznamenáváme hodnoty potenciálu.

Vyhodnocení:

Roztoky	E (V)	$\log([\text{ferrikyanid}]/[\text{ferrokyanid}])$
ferrokyanid + 7,5 μl ferrikyanidu		
+ 7,5 μl ferrikyanidu		
+ 7,5 μl ferrikyanidu		
+ 7,5 μl ferrikyanidu		
+ 7,5 μl ferrikyanidu		
+ 7,5 μl ferrikyanidu		
+ 15 μl ferrikyanidu		
+ 15 μl ferrikyanidu		
+ 15 μl ferrikyanidu		

Koncentrace, resp. poměry oxidované a redukované formy hexakynoželezitanu a hexakynoželeznatanu, jsou známy a lze je spočítat z koncentrací zásobních roztoků. Vyneseme graf závislosti E na $\log\left(\frac{[K_3[Fe(CN)_6]]}{[K_4[Fe(CN)_6]]}\right)$, 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: $E^{\circ}\left(\frac{[K_3[Fe(CN)_6]]}{[K_4[Fe(CN)_6]]}\right) = +0,43 \text{ V}$; $n = 1$.

Protokol:

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

Graf závislosti E na $\log\left(\frac{[K_3[Fe(CN)_6]]}{[K_4[Fe(CN)_6]]}\right)$.

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

2) Metoda redoxního pufru

Přístroje:

Automatické pipety 1-10 μl , 5-20 μl , 100-1000 μl , 1000-5000 μl , plastové špičky
Spektrofotometr UV-VIS Ultrospec 2000

Materiál:

Plastové míchadlo
3ml spektrofotometrické plastové kyvety

Chemikálie:

0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$ (z předchozí úlohy)
0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ (z předchozí úlohy)
0,1 M sodno-fosfátový pufr (pH 7,0) (z předchozí úlohy)
10 ml 0,5 mg/ml cytochromu c (cyt c) v 0,1 M sodno-fosfátovém pufru (pH 7,0)
 $Na_2S_2O_4$ (krystalky)

Postup:

Pracovní prostor spektrofotometru necháme temperovat na teplotu 25 °C. Připravíme 4 kyvety. Slepý vzorek (blank) bude tvořit 3000 μl ml 0,1 fosfátového pufru. Zbývající 3 pracovní roztoky se připraví smícháním 2700 μl ml roztoku cytochromu c buď s 300 μl ml 0,1 M fosfátového pufru a dosypáním několika krystalků $Na_2S_2O_4$ (redukovaný standard), nebo s 300 μl 0,1 M $K_3[Fe(CN)_6]$ (oxidovaný standard), nebo s 300 μl roztoku 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$. K tomuto poslednímu roztoku budeme postupně přidávat roztok z předchozí kyvety s $K_3[Fe(CN)_6]$ jak je naznačeno ve vzorové tabulce. Měříme absorbance při 550 nm. Absorbance budou zaznamenávány do tabulky dle vzoru.

Roztoky	A550	$\log([\text{cyt } c_{\text{ox}}]/[\text{cyt } c_{\text{red}}])$	$\log([\text{ferri}]/[\text{ferro}])$
cyt c + Na ₂ S ₂ O ₄ – kyveta 1			
cyt c + ferri – kyveta 2			
cyt c + ferro – kyveta 3 + 7,5 μl roztoku z kyvety 2			
+ 7,5 μl roztoku z kyvety 2			
+ 7,5 μl roztoku z kyvety 2			
+ 7,5 μl roztoku z kyvety 2			
+ 7,5 μl roztoku z kyvety 2			
+ 7,5 μl roztoku z kyvety 2			
+ 15 μl roztoku z kyvety 2			
+ 15 μl roztoku z kyvety 2			
+ 15 μl roztoku z kyvety 2			

Vyhodnocení:

Poměry $[\text{cyt } c_{\text{ox}}]/[\text{cyt } c_{\text{red}}]$ vypočteme pomocí rovnice (8). Koncentrace, resp. poměry oxidované a redukované formy hexakynoželezitanu a hexakynoželeznanu, jsou známy a lze je spočítat z koncentrací zásobních roztoků. Vyneseme graf závislosti $\log([\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]]/[\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]])$ na $\log([\text{cyt } c_{\text{ox}}]/[\text{cyt } c_{\text{red}}])$, body proložíme lineární regresní přímkou a uvedeme v protokolu vedle grafu i rovnici této přímky. Úpravou rovnice 3 vypočítáme standardní redoxní potenciál redoxního páru $\text{cyt } c_{\text{ox}}/\text{cyt } c_{\text{red}}$, když je známo, že $E_7^0([\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]]/[\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]]) = +0,43 \text{ V}$ a $n = 1$.

Protokol:

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

Graf závislosti $\log([\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]]/[\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]])$ na $\log([\text{cyt } c_{\text{ox}}]/[\text{cyt } c_{\text{red}}])$.

Výpočet standardního redoxního potenciálu $\text{cyt } c$ a počtu přenášených elektronů a srovnání s tabelovanými hodnotami.

3) Metoda redoxního indikátoru

Přístroje:

Automatické pipety 1-10 μl, 5-20 μl, 100-1000 μl, 1000-5000 μl, plastové špičky
Hamiltonova jehla 1-5 μl
Spektrofotometr UV-VIS Ultrospec 2000

Materiál:

Parafilm

1ml spektrofotometrické plastové kyvety s gumovou zátkou

Chemikálie:

0,1 M sodno-fosfátový pufr (pH 7,0) (z předchozí úlohy)

Na₂S₂O₄ (krystalky)

0,01 M cyt c

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

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

10 mM benzylviologen (pomocný přenašeč elektronů od enzymu)

Xanthinoxidasa (mléčná)

Argon v tlakové lahvi

Návod k měření a zaznamenání spekter:

1. Zapneme hlavní vypínač na počítači a spektrofotometru UV-VIS Ultrospec 2000.
2. Plocha → SWIFT Bio-ws → File → Open → Parameters → redoxit.ws1
3. Run → Standard → Samples = 10 ⇒ OK → File already exists! Overwrite? ⇒ Yes → 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 0–3)

Postup:

Kyvetový prostor spektrofotometru ponecháme temperovaný na 25 °C. Do 1ml kyvety odměříme 888 μl 0,1 M sodno-fosfátového pufru, 4 μl 0,01 M cyt c, 16 μl 0,01 M DCIP, 1 μl benzylviologenu a 90 μl 0,01 M xanthinu. Horní vstup kyvety zavřeme gumovou zátkou a utěsníme omotáním parafilmem. Necháme roztok probublávat argonem po dobu 10 minut.

Mezitím si připravíme blank (1 ml fosfátového pufru) a 4 standardy pro oxidované a redukované formy obou redoxaktivních látek (viz tabulka). Odečteme absorbance pro minimálně 6 odlišných vhodně vybraných vlnových délek (např. 450, 535, 550, 565, 600, 635 nm).

	pufr (μl)	xanthin (μl)	cyt c (μl)	DCIP (μl)	krystalky Na ₂ S ₂ O ₄
cyt c ox.	906	90	4	-	-
DCIP ox.	894	90	-	16	-
cyt c red.	906	90	4	-	ano
DCIP red.	894	90	-	16	ano

Ve spektrometru změříme blank jako referenci a poté do přístroje přeneseme kyvetu se směsí probublanou argonem. Následně zaznamenáme spektrum tohoto roztoku jako spektrum číslo 1 v čase 0 min. Poté nastartujeme redukci cyt c a DCIP přidáním 1 μ l roztoku xanthinoxidasy Hamiltonovou jehlou. Postupně v časových intervalech po 1 minutě zaznamenáme 9 dalších spekter. Odečteme absorbance pro shodné vlnové délky, jaké byly použity u standardů.

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 Excel. Dosazením do neupravené rovnice 3 vypočítáme standardní redoxní potenciál cyt c. E_{red}^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.