

2. Badanie kinetyki enzymów

Niemal wszystkie reakcje zachodzące w organizmach żywych przebiegają przy udziale bardzo silnych i wyjątkowo specyficznych biokatalizatorów zwanych enzymami. Międzynarodowa Unia Biochemii zaproponowała w 1964 roku podział enzymów na 6 klas w zależności od katalizowanej reakcji. Najliczniej reprezentowaną klasę enzymów stanowią hydrolazy (klasa EC 3). Enzymy te katalizują reakcje hydrolizy wiązań chemicznych występujących w związkach naturalnych. Przedmiotem niniejszego ćwiczenia będzie oznaczenie aktywności enzymatycznej bydlęcej β -trypsyny (enzym proteolityczny).

Główną podklasę hydrolaz stanowią enzymy uczestniczące w hydrolizie wiązań peptydowych. Są one określane ogólnym terminem peptydaz lub proteaz (EC 3.4). Wśród peptydaz wyróżniane są endopeptydazy (zwane też proteinazami), które hydrolizują wiązania peptydowe wewnątrz łańcucha polipeptydowego i białkowego (np. β -trypsyna) oraz egzopeptydazy, odpowiadające za hydrolizę skrajnych wiązań peptydowych. Do tej ostatniej grupy należą m.in. amino- i karboksypeptydazy odcinające pojedyncze reszty aminokwasowe odpowiednio od N- i C-końców łańcucha peptydowego.

W zależności od mechanizmu działania proteinazy dzielone są na kilka podgrup, takich jak: serynowe, cysteinowe, aspartylowe i metaloproteinazy.

Trypsyna należy do podgrupy proteinaz serynowych, w której bardzo ważną rolę odgrywa grupa hydroksylowa reszty Ser¹⁹⁵. Enzym ten hydrolizuje wiązania peptydowe jakie tworzą grupy karboksylowe zasadowych reszt aminokwasowych: Arg i Lys. Enzym ten pełni szereg bardzo ważnych funkcji fizjologicznych. Zarówno jej niedobór, jak również nadmierne stężenie, prowadzić może do bardzo groźnych stanów patologicznych (np. zapalenie i nowotwór trzustki). Z tego też powodu w organizmach żywych funkcjonują bardzo sprawne mechanizmy kontrolujące poziom tego enzymu. Związkami, które zapobiegają niekontrolowanej proteolizie są powszechnie występujące w organizmach roślinnych i zwierzęcych inhibitory proteinaz serynowych (w tym i trypsyny). Inhibitory te są najczęściej białkami o masie cząsteczkowej od 3 do blisko 700 kD. Zadaniem niniejszego doświadczenia będzie badanie zależności aktywności trypsyny od pH oraz oznaczanie kinetyki hamowania trypsyny przez inhibitor trypsyny wyodrębniony z nasion soi. Stosowana w doświadczeniu metoda oznaczania aktywności trypsyny polega na spektrofotometrycznym oznaczaniu *p*-nitroaniliny uwalnianej w czasie reakcji trypsyny z jej substratem, *p*-nitroanilidem benzoilo-D,L-argininy. Mierzona przy długości fali 410 nm absorpcja *p*-nitroaniliny jest wprost proporcjonalna do aktywności trypsyny.

Odczynniki i sprzęt laboratoryjny:

1. Spektrofotometr UV-Vis
2. Kuwety plastikowe
3. Roztwór trypsyny: 0,8 mg enzymu w 1 mL 1 mM roztworu HCl
4. Roztwór inhibitora: 0,25 mg w 1 mL wody
5. Roztwór substratu (*p*-nitroanilidu benzoilo-D,L-argininy) 5 mg w 1 mL DMSO
6. Bufory o pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 8,3; 9,0; 10,0
7. 30% kwas octowy
8. Probówki zwykłe szklane
9. Stoper
10. Pipety miarowe automatyczne 20-200 μ L oraz 100-1000 μ L

Wykonanie doświadczenia:

1. Oznaczanie zależności aktywności trypsyny od pH

Przygotować 9 probówek (lub kuwet). Do pierwszej dodać 2 mL wody, do kolejnych dodać po 2 mL buforów o różnym pH. Do probówki 1 (odnośnik) dodać 50 μ L wody, natomiast do pozostałych dodać po 50 μ L roztworu trypsyny. Następnie, do wszystkich probówek dodać jak najszybciej po 50 μ L roztworu substratu, *p*-nitroanilidu benzoilo-D,L-argininy i delikatnie zamieszać zawartość probówki. Po 10 min przerwać reakcję poprzez dodanie po 100 μ L 30% roztworu kwasu octowego. Następnie delikatnie zamieszać.

Zmierzyć absorbancję przy długości fali 410 nm.

Wykreślić krzywą zależności aktywności trypsyny od pH. Przedyskutować otrzymane wyniki.

2. Badanie przybliżonej kinetyki hamowania aktywności trypsyny

Do 9 probówek zawierających po 2 mL buforu o pH 8,3 dodać po 50 μ L roztworu trypsyny. Następnie do probówek od 2 do 9 dodać, możliwie w jak najkrótszym czasie, następujące objętości roztworu inhibitora (UWAGA: do probówki 1 nie dodajemy inhibitora): 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 70 μ L, 80 μ L, 100 μ L (objętości dodawanego inhibitora przekonsultować z prowadzącym zajęcia) i delikatnie zamieszać zawartość probówek. Po 15 minutach inkubacji do wszystkich probówek dodać po 50 μ L roztworu substratu, *p*-nitroanilidu benzoilo-D,L-argininy. Po kolejnych 15 minutach przerwać reakcje poprzez dodanie do wszystkich probówek, możliwie jak najszybciej, po 100 μ L 30% roztworu kwasu octowego. Następnie delikatnie zamieszać.

Za pomocą spektrofotometru UV-Vis zmierzyć absorbancję roztworów z poszczególnych probówek przy długości fali 410 nm, stosując jako odnośnik probówkę 1 (wzorzec) z ćwiczenia 1. Wykreślić krzywą zależności absorbancji od objętości dodanego roztworu inhibitora.

UWAGA: Określić przybliżoną masę cząsteczkową inhibitora wychodząc z założenia, że reakcja przebiega według stechiometrii 1:1 i nieodwracalnie ($E + I \approx EI$) oraz połowa spadku aktywności trypsyny ($E_{410}(50\%)$) odpowiada połowie zablokowania trypsyny. Masa cząsteczkowa trypsyny wynosi 24000 Da.

Zakres materiału:

Klasyfikacja enzymów, zasada działania enzymów, mechanizmy inhibicji, sposoby regulacji aktywności enzymów, proteiny serynowe (trypsyna, elastaza, chymotrypsyna).