ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY 1. LF UK

Enzymy

Praktické cvičení z lékařské biochemie

Všeobecné lékařství

Jiří Kraml, Jiřina Crkovská, Jan Plátenník

2019/2020

1. Důkaz specifičnosti enzymů

Princip:

Enzymy působí specificky jak vzhledem k **typu** katalyzované reakce, tak i vzhledem k **substrátu**. Pokud jde o **substrát**, mají některé enzymy poměrně širokou **specifičnost**, např. některé esterázy štěpí nejrůznější přirozené i umělé estery. Jiné enzymy mají specifičnost velice úzkou, jako např. ureáza, která štěpí pouze močovinu. V této úloze vyzkoušíme, jaká je specifičnost **sacharázy** z kvasnic a slinné **amylázy**. Oběma enzymům jako substrát nabídneme sacharózu a škrob. Amyláza štěpí α-1,4-glykosidové vazby ve struktuře škrobu, produktem je směs oligosacharidů. Sacharáza hydrolyzuje sacharózu na glukózu a fruktózu. Jelikož v obou případech vznikají redukující sacharidy, zatímco výchozí substráty redukující nejsou, štěpení substrátu můžeme prokázat Fehlingovou zkouškou.

Podrobněji k používaným enzymům:

Glykosidázy patří mezi hydrolázy (podpodtřída 3.2.1 mezinárodní nomenklatury enzymů). Jsou specifické vůči **typu glykosidové vazby** (α-glykosidázy nebo β-glykosidázy).

Amyláza, ať už rostlinného nebo živočišného původu, štěpí **1,4-α-glykosidové** vazby škrobu, glykogenu a polysacharidů. Vazby β-glykosidové, např. v celulóze, hydrolyzovat nedokáže.

Jako α-**amyláza** (EC 3.2.1.1.) se označuje enzym, který se vyskytuje ve slinách a pankreatické šťávě živočichů. Štěpí **endohydrolýzou 1,4-α-glykosidové vazby** polysacharidů obsahujících tři a více 1,4-α-glykosidově vázaných glukózových jednotek. Výsledkem hydrolytického štěpení amylózy je směs **maltózy** a **glukózy** s hemiacetalovými hydroxyly uvolněnými jako α-**anomery**. Amylopektin a glykogen štěpí α-amyláza náhodně na 1,4-α-glykosidových vazbách, přičemž **1,6-α-** vazby zůstávají nedotčeny. Výslednými produkty tak jsou **větvené** i **nevětvené oligosacharidy**. Enzymová hydrolýza **škrobu** α-amylázou má několik fází, které se projeví také reakcí s jódem. Škrob se barví jodem temně modře, štěpné polysacharidy – dextriny fialově (amylodextrin), purpurově až červeně (erytrodextrin), popř. se nebarví jódem vůbec (achrodextrin). Během štěpení škrobu také ve směsi přibývá redukujících cukrů.

Jako β-**amyláza** (EC 3.2.1.2) se označoval enzym **rostlinného původu**, obsažený např. ve sladu, který štěpí 1,4-α-glykosidové vazby od neredukujícího konce polysacharidového řetězce. Z amylózy vzniká maltóza, která se uvolňuje jako β-anomer, dochází tedy k inverzi. Amylopektin tento enzym štěpí rovněž z neredukujícího konce až k větvení 1,6-α-, které už tento enzym rozštěpit nemůže. Konečný produkt tohoto typu hydrolýzy škrobu je tzv. limitní dextrin. Ani živočišná α-amyláza, ani rostlinná β-amyláza tedy **neštěpí vazby 1,6-α-**, ani **1,4-β-glykosidovou vazbu.**

Jako tzv. γ-**amyláza** (glukoamyláza, EC 3.2.1.20) se označuje enzym obsažený v **membráně enterocytů** tenkého střeva. Je termostabilní (proto též označení *termostabilní maltáza*), štěpí **polysacharidy** a ještě lépe **maltózu.** Hydrolýza probíhá od neredukujícího konce, štěpí se při ní vazby **1,4-α** a výsledným produktem je β-**glukóza**.

Sacharáza z kvasnic je β-**fruktofuranosidáza**, která štěpí β-glykosidovou vazbu v sacharóze. Na první pohled podobná **sacharáza z kartáčového lemu enterocytů** tenkého střeva savců, sacharosa-α-D-glukohydrolasa (EC 3.2.1.48), má odlišnou specifičnost – štěpí α-glykosidovou vazbu, takže kromě **sacharózy** hydrolyzuje i **maltózu.**

Vazby **1,6-α-,** které zůstávají v **isomaltóze, amylopektinu, glykogenu** a **oligosacharidech**, jež vznikly v tenkém střevě trávením škrobu a glykogenu α-**amylázou**, se odbourávají převážně **isomaltázovou** podjednotkou **sacharázového-isomaltázového komplexu** kartáčového lemu, oligosacharid-α-glukohydrolázou, (oligo-1,6-glukosidáza, EC 3.2.1.10.).

Sacharázový-isomaltázový komplex kartáčového lemu se syntetizuje jako jediný polypeptidový řetězec. Proteolytické enzymy z lumen tenkého střeva pak tento bílkovinný řetězec naštěpí, čímž vzniknou samostatné funkční podjednotky sacharázového-isomaltázového komplexu. Obě podjednotky katalyzují hydrolýzu **maltózy** (reprezentují asi 80 % veškeré maltázové aktivity tenkého střeva). Kromě toho dokáže **sacharázová** podjednotka štěpit i **sacharózu.** Jak uvedeno výše, **isomaltázová** podjednotka může také odbourávat vazby **1,6-α-** např. v isomaltóze či v dextrinech.

Reagencie:

1) Škrobový maz 10 g/l (1 g škrobu třepat nebo zahřívat s vodou, suspenzi lít pomalu do 100 ml vroucí vody, povařit 2–3 minuty)
2) Sacharóza 10 g/l (roztok denně čerstvý)
3) Sacharáza z kvasnic
4) a-amyláza: sliny zředěné v poměru 1:10
5) Fehling I: $CuSO_4$. 5 H_2O 70 g/l
6) Fehling II: NaOH 250 g a vinan draselno-sodný 350 g v 1 l čištěné vody
7) Lugolův roztok: jód 20 g v 1 l nasyceného roztoku jodidu draselného; pro použití se ředí 5 kapek Lugolova roztoku do 10 ml čištěné vody

Pracovní postup

a. Připravte roztok amylázy: v kádince zřeďte malé množství vlastních slin čištěnou vodou přibližně 10×.

b. Očíslujte čtyři dlouhé zkumavky a smíchejte v nich reakční směsi dle tabulky:

	1	**2**	**3**	**4**
Škrob	5 ml	-	5 ml	-
Sacharóza	-	5 ml	-	5 ml
Amyláza	1 ml	1 ml	-	-
Sacharáza	-	-	1 ml	1 ml

c. Všechny zkumavky inkubujte 30 minut v termobloku při 37 °C.

d. Připravte asi 10 ml Fehlingova činidla: v kádince smíchejte přibližně stejné díly roztoků Fehling I ($CuSO_4$) a Fehling II (vinan sodno-draselný s NaOH).

e. Použijte Fehlingovu zkoušku k detekci štěpení substrátu: Vezměte čtyři nové dlouhé zkumavky, očíslujte je, do každé dejte asi 1 ml připraveného Fehlingova činidla a přidejte několik kapek z odpovídající původní reakční směsi. Zkumavky zahřívejte ve vroucí vodní lázni a sledujte barevné změny. Původní Fehlingovo činidlo je tmavě modré. Změna zbarvení do zelené, oranžové nebo červené znamená tvorbu Cu_2O a je důkazem přítomnosti redukujících látek, tedy v našem případě štěpení substrátu.

f. Zjistěte, ve kterých zkumavkách zůstal nerozštěpený škrob: zřeďte si ve zkumavce Lugolův roztok (5 kapek/asi 10 ml vody). Přibližně 1 ml každého testovaného roztoku přeneste do nové zkumavky a přidejte několik kapek ředěného Lugolova roztoku. Přítomnost škrobu se projeví jako tmavě modré zbarvení.

2. Vliv pH na aktivitu enzymu

Princip:

Vliv pH na aktivitu enzymu si ukážeme na příkladu pepsinu. **Pepsin** je trávicí enzym, který štěpí bílkoviny. Různé živočišné druhy tvoří různé, mírně odlišné formy pepsinu s různým označením. Všechny patří do skupiny **aspartátových endopeptidáz** (EC 3.4.23), tj. v aktivním centru obsahují dva proti sobě orientované zbytky kyseliny asparagové, které se podílejí na kyselé katalýze.

Pepsiny nejlépe pracují v kyselém prostředí. U člověka vzniká aktivní pepsin z neaktivního prekurzoru, pepsinogenu, odštěpením části polypeptidového řetězce. K této aktivaci může dojít buď samovolně (**autoaktivací**) při pH nižším než 5, nebo působením již aktivní molekuly pepsinu (**autokatalýzou**). Peptidy, které se během aktivace pepsinogenu odštěpily, zůstávají navázané na pepsin a působí jako **inhibitory** pepsinové aktivity. Posledním krokem aktivace enzymu tak je oddělení těchto inhibičních peptidů, k němuž dojde při poklesu pH prostředí pod 2.

Lidský **pepsin A** má 5 molekulárních forem. Hydrolyzuje peptidové vazby uvnitř polypeptidového řetězce (endohydrolýza), přičemž je specifický k oblastem, které obsahují hydrofobní aminokyselinové zbytky – především aromatické (Phe), ale i alifatické (Leu). V jiných částech žaludku se podobným mechanismem tvoří i **pepsin B**. Další enzym, **pepsin C**, se u člověka označuje také jako jako **gastriksin**. Štěpí endohydrolýzou přednostně peptidové vazby za zbytkem aminokyseliny Tyr a je méně specifický než pepsin A.

Optimální pH pepsinu poněkud kolísá podle toho, jaký substrát má tento enzym hydrolyzovat. Např. pro vaječný albumin je pH optimum pepsinu A kolem 1,5, pro hemoglobin je vyšší (2,3).

V této praktické úloze se pokusíme odhadnout, v jaké oblasti leží pH optimum pepsinu pro bílkoviny vaječného bílku.

Reagencie:

1) Roztok pepsinu 10 g/l

2) Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l

3) Suspenze vaječného bílku (vařený bílek se homogenizuje ve fyziologickém roztoku – konečná koncentrace asi 300 g/l)

Pracovní postup:

Do čtyř očíslovaných zkumavek odměřte roztoky podle tabulky (suspenzi vaječného bílku před použitím protřepat!):

		1	2	3	4
Konečné pH		**1.2**	**1.5**	**2.5**	**kontrola**
Roztok pepsinu	ml	2.0	2.0	2.0	-
HCl	ml	4.0	2.0	0.2	2.0
Čištěná voda	ml	-	2.0	3.8	4.0
Suspenze bílku	ml	1.0	1.0	1.0	1.0

Inkubujte zkumavky přibližně **10 minut** při 37 °C v termobloku.

Vyhodnocení:

Po skončení inkubace se hodnotí projasnění obsahu zkumavek, ke kterému došlo natrávením bílkovin vaječného bílku. Použijte semikvantitativní stupnici, např.: + úplné projasnění, ± částečné projasnění a – přetrvávající zákal.

Výsledky zapište do tabulky v protokolu a určete, v jaké oblasti pH leží optimum pro práci enzymu.

3. Oxidoreduktázy

Úvod: Význam biologických oxidací v organismu

Většina energie v živočišném organismu pochází z oxidoredukčních pochodů. Oxidační produkty reakce mají menší obsah energie než výchozí reagující látky a energie je uvolňována jako teplo nebo je transformována na jiné druhy využitelné energie, např. na energii chemické vazby. Četné oxidace jsou spojeny s tvorbou „makroergických“ fosfátových esterů anhydridové povahy (ATP, ADP), jež mají zvláštní důležitost při konzervaci a přenosu energie. Vytvářejí se z energie uvolněné v buňce při oxidačních reakcích. Oxidoredukce mohou probíhat anaerobně, např. v glykolýze, nebo aerobně, např. při oxidaci substrátů citrátového (Krebsova) cyklu nebo β-oxidací mastných kyselin v mitochondriích.

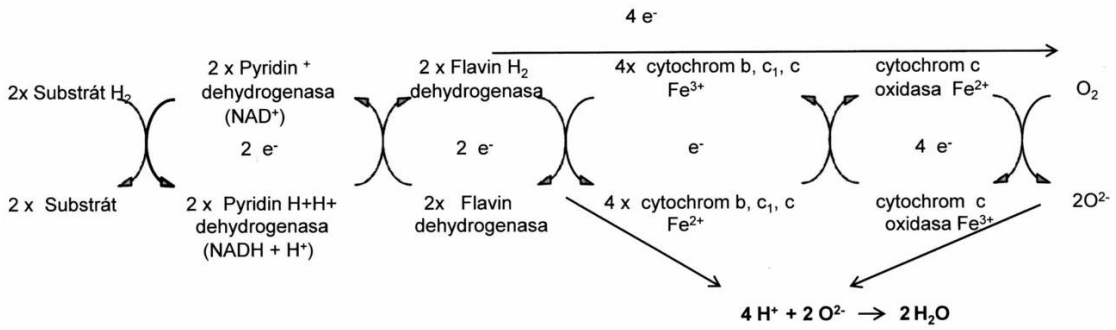
Cukry, lipidy a bílkoviny představují zdroje energie v organismu, ale oxidace neprobíhají většinou přímo s molekulárním kyslíkem ani při aerobních oxidoredukcích (s výjimkou tzv. oxygenáz).

Při oxidoredukčních pochodech v mitochondriích je přenášen vodík ze substrátů na kyslík řadou přenašečů, jež vytvářejí mezi sebou přesně navazující systém enzymů. Tento řetěz oxidoredukčních pochodů (buněčné dýchání) probíhá ve dvou stupních:

1. Přenos vodíku účinkem dehydrogenáz, jež obsahují jako koenzym pyridin- a flavinnukleotidy.

2. Přenos elektronů zejména prostřednictvím cytochromů (v mitochondriích). Významný je poslední stupeň, kde autooxidabilní cytochromoxidáza reaguje přímo s molekulárním kyslíkem za tvorby vody.

Oxidoredukční sled reakcí probíhá ve vnitřní mitochondriální membráně v tzv. dýchacím (respiračním) řetězu, který je velmi schematicky vyjádřen jako dvouelektronový přenos, neboť molekulám organických substrátů jsou elektrony prostřednictvím dehydrogenázových koenzymů při biologických oxidacích odnímány v párech. Na úrovni cytochromů je však přenos jednoelektronový a na úrovni cytochromoxidázy při redukci molekuly O_2 čtyřelektronový.



Při dvouelektronovém přenosu ze substrátů (nejčastěji) citrátového cyklu na molekulární kyslík se současně vytvářejí molekuly ATP - tzv. aerobní (oxidační) fosforylace.

Akceptorem elektronů však nemusí být vždy kyslík. Některé dehydrogenázy odevzdávají elektrony i jiným akceptorům, např. pyruvátu (laktátdehydrogenáza) nebo *in vitro* i arteficiálním akceptorům, jako je methylenová modř (flavinové dehydrogenázy). Jde tu o anaerobní oxidoredukce.

V našem cvičení bude modelově demonstrována oxidoredukce glukózy vzdušným kyslíkem za katalýzy methylenovou modří, která bude fungovat jako dočasný akceptor elektronů. Její redukovaná forma (leukobáze) je bezbarvá, ale je autooxidabilní a třepáním se vzduchem opět přechází v barevnou oxidovanou formu.

Z dehydrogenáz, kromě laktátdehydrogenázy, bude ukázána dehydrogenace xanthinoxidoreduktázou (xanthinoxidázou) z mléka, kde substrátem bude formaldehyd a akceptorem elektronů methylenová modř.

Vedle dehydrogenáz a cytochromů patří k oxidoreduktázám (kromě jiných) také peroxidázy a kataláza rozkládající H_2O_2. Peroxidáza katalyzuje oxidaci vhodného substrátu

$$AH_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + A,$$

kdežto kataláza uvolňuje molekulární kyslík při reakci

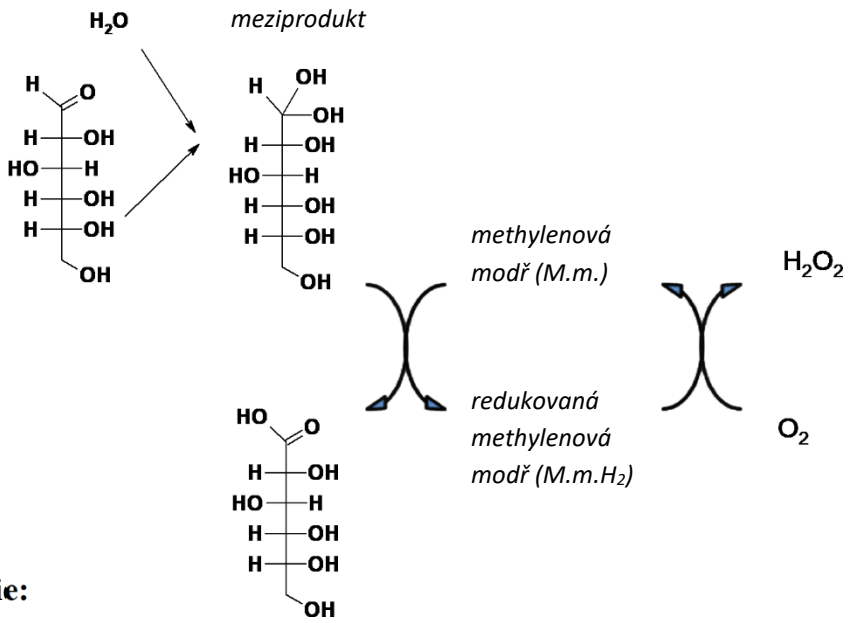
$$2\,H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2.$$

V naší úloze bude ukázáno působení peroxidázy z brambor, kde donorem elektronů bude derivát benzidinu (4,4′-diaminobifenylu), který se oxiduje na oxidovaný barevný produkt. Současně budeme prokazovat katalázu v krvi a neenzymovou katalýzu krevním barvivem, která účinek peroxidázy připomíná (tzv. pseudoperoxidázová reakce).

3.1. Oxidace glukózy vzdušným kyslíkem (modelový pokus)

Princip:

Tento pokus je modelem oxidoredukčního systému, kde akceptorem vodíku je autooxidabilní barvivo,methylenová modř, donorem redukčních ekvivalentů je glukóza, která se oxiduje. Methylenová modř je ve stavu oxidovaném modrá, redukcí přechází v bezbarvou "leukoformu". Vzdušným kyslíkem (třepáním) opět zmodrá.



Reagencie:

1) Glukóza 2,5 g/l
2) Methylenová modř 0,5 g/l
3) Hydroxid sodný 80 g/l

Pracovní postup:

a. 1 ml roztoku glukózy smíchejte ve zkumavce s 50 µl roztoku methylenové modři, přidejte 3 kapky roztoku NaOH a zahřejte ve vroucí vodní lázni. Modrý roztok methylenové modři (M.m.) je hydrogenován na bezbarvou leukoformu (M.m.H_2).

b. Souběžně zpracujte kontrolní vzorek. Místo glukózy napipetujte 1 ml deionizované vody.

c. Zkumavky ochlaďte a protřepejte na vzduchu (oxidace).

d. Porovnejte průběh reakce v obou zkumavkách a vysvětlete rozdíl.

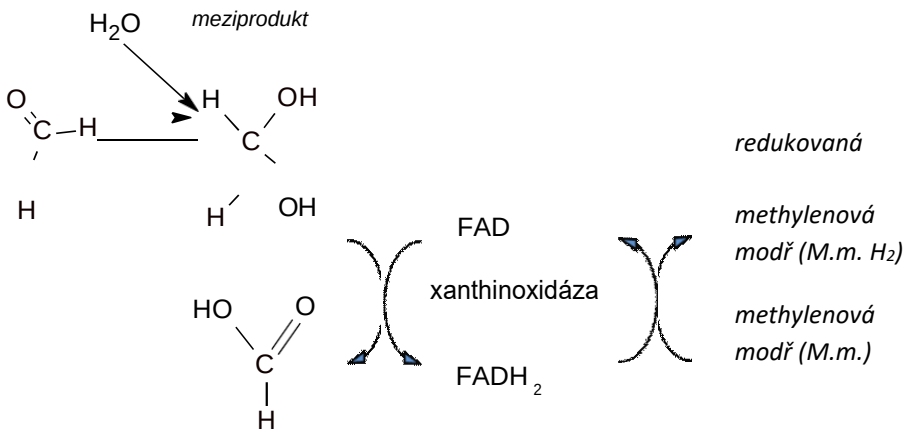
3.2. Dehydrogenace xanthinoxidoreduktázou (xanthinoxidázou)

Princip:

Xanthinoxidáza (EC 1.17.3.2) je relativně nespecifická dehydrogenáza obsažená např. v mléce (Schardingerův enzym), v savčích játrech a mnoha dalších tkáních. Jejím působením vzniká z purinů (hypoxanthinu a xanthinu) jejich degradační produkt, kyselina močová. Kromě toho xanthinoxidáza může oxidovat i pteriny a další substráty, mj. i jednoduché aldehydy (má tedy i aktivitu aldehydoxidázy EC 1.2.3.1). Je to flavinový enzym, jehož koenzymem je flavinadenindinukleotid (FAD), avšak v aktivním centru obsahuje též atomy kovů (Mo, Fe). Dehydrogenací substrátu vzniká $FADH_2$, který může být reoxidován molekulárním kyslíkem (autooxidace) za vzniku H_2O_2, nebo arteficiálním akceptorem (methylenová modř). Enzym není inhibován kyanidem, ale varem se ničí.

V savčích játrech a jiných tkáních za fyziologických okolností *in vivo* existuje xanthinoxidáza převážně v tzv. dehydrogenázové D-formě (EC 1.17.1.4), která reoxiduje $FADH_2$ proti dalšímu koenzymu NAD^+. Poškozením této D-formy za patologických okolností a též při nešetrné práci s enzymem *in vitro* ztrácí D-forma vazebné místo pro NAD^+ a mění se tak na oxidázovou O-formu (EC 1.17.3.2).

Jako nespecifický substrát použijeme v našem pokuse roztok formaldehydu, jako akceptor elektronů pro reoxidaci $FADH_2$ methylenovou modř a jako zdroj enzymu nepasteurované kravské mléko.



Reagencie:

1) Mléko nesvařené (nepasteurované)
2) Mléko svařené
3) Methylenová modř 0,5 g/l
4) Roztok formaldehydu 4 g/l
5) KCN 10 g/l

Pracovní postup:

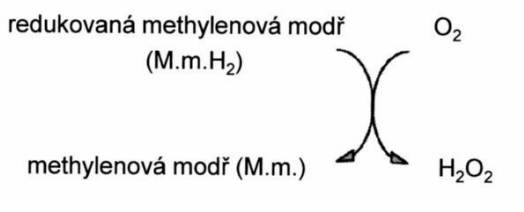
a. Do tří zkumavek připravte reakční směs podle tohoto schématu:

	1	**2**	**3**
Čerstvé mléko	2 ml	-	2 ml
Svařené mléko	-	2 ml	-
Methylenová modř	100 µl	100 µl	100 µl
KCN (pozor jed!)	-	-	0,2 ml
Deionizovaná H_2O	0,2 ml	0,2 ml	
Formaldehyd	250 µl	250 µl	250 µl
Obsah zkumavek dobře promíchat			
Parafinový olej * (převrstvit ihned po namíchání)	1 ml	1 ml	1 ml

Pozn. ** Parafinový olej má zabránit autooxidaci (zajistit anaerobní průběh reakce)*

b. Zkumavky vložte do suchého bloku, inkubujte při 37 °C a kontrolujte průběh reakce přibližně každých 5 minut, až zkumavka č. 1 je zcela odbarvená.

c. Zkumavku č. 1 protřepejte se vzduchem a mléko opět zmodrá, neboť probíhá reakce:



d. Po vložení zpět do termobloku se methylenová modř opět odbarví.

Vyhodnocení:

Srovnejte a popište výsledky ve zkumavce č. 2 a 3 a srovnejte se zkumavkou č. 1. Vysvětlete výsledky.

3.3. Peroxidáza a kataláza

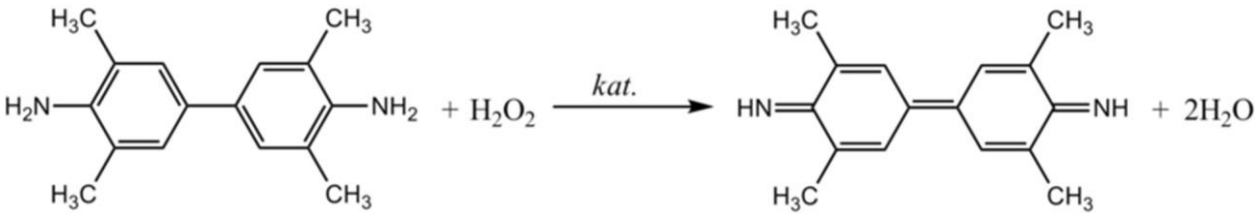
Princip:

Peroxid vodíku vzniklý při oxidačních pochodech v buňce je rozkládán enzymy zvanými peroxidázy a kataláza. Patří do skupiny heminových enzymů (hemoproteinů). Průběh reakce je u obou enzymů rozdílný.

Peroxidázy katalyzují oxidaci substrátu účinkem peroxidu vodíku za vzniku vody (viz teoretický úvod). Peroxidázy (EC 1.11.1.7) jsou obsaženy v rostlinných i živočišných organismech.

Kataláza (EC 1.11.1.6) jednak rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík, jednak má peroxidázový účinek. Vyskytuje se ve větším nebo menším množství ve všech tkáních (v tzv. peroxisomech) a v tekutinách organismu. Význam tkví hlavně v rozkladu H_2O_2 škodlivého pro organismus.

V tomto cvičení bude prokazována peroxidázová reakce kvalitativně oxidací derivátu benzidinu na modré barvivo. Současně bude ukázána pseudoperoxidázová aktivita moči obsahující krevní barvivo (nespecifický vliv železa v hemu). Dále bude prokazován kvalitativně účinek katalázové aktivity krve na H_2O_2 za vývoje O_2.



tetramethylbenzidin (bezbarvý) benzidinová modř

Tetrametylbenzidin. In *WikiSkripta* [online]. Praha : MEFANET, 2008- [cit. 2012-01-05].
Dostupné z WWW: <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Tetrametylbenzidin&oldid=109016>. ISSN 1804-6517.

Reagencie:

1) Extrakt z brambor (obsahující peroxidasu)
2) Moč s krví
3) Krev zředěná vodou 1 : 50
4) 3,3´-dimethylbenzidin (tolidin)
5) Koncentrovaná kyselina octová
6) Peroxid vodíku 3 g/l
7) KCN 10 g/l

3.3.1. Důkaz peroxidázy benzidinovou reakcí

Princip:

Derivát benzidinu (3,3´-dimethylbenzidin - tolidin) se působením peroxidázy a peroxidu vodíku oxiduje na barevný oxidovaný produkt.

Pracovní postup:

a. Rozpusťte několik krystalů tolidinu v cca 1 ml koncentrované kyseliny octové.
b. Reakční směsi připravte do 4 zkumavek takto:
Pozn. ** ve zkumavce 2 extrakt z brambor povařte 5 min ve vroucí vodní lázni a ochla*ďte.

	1	**2**	**3**	**4**
Extrakt z brambor	1,0 ml	-	-	1,0 ml
Extrakt z brambor povařený	-	1,0 ml*		
Deionizovaná H_2O	-	-	1,0 ml	100 µl
H_2O_2	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Tolidin v kyselině octové	100 µl	100 µl	100 µl	-

Vyhodnocení:

Porovnejte výsledek ve zkumavce č. 1 se zkumavkami č. 2, 3 a 4. Vysvětlete rozdíly.

3.3.2. Pseudoperoxidázová reakce

Princip:

Krev v moči katalyzuje oxidaci derivátu benzidinu peroxidem vodíku i po povaření. To ukazuje na to, že jde o nespecifický vliv železa v hemu, nikoli o enzymovou aktivitu.

Pracovní postup:

a. Asi 4 ml moči obsahující krev rozdělte na 2 části.
b. Jeden díl zahřejte na vroucí vodní lázni k varu.
c. Obě moče přefiltrujte.
d. Na filtrační papír dejte několik kapek roztoku tolidinu v koncentrované kyselině octové (viz předchozí pokus) a poté peroxid vodíku.

Vyhodnocení:

Srovnejte výsledek obou zkoušek s pokusem 3.3.1. V čem spočívá rozdíl obou pokusů a co tento rozdíl ukazuje?

3.3.3. Důkaz katalasy

Pracovní postup:

Reakční směs připravte podle tohoto schématu:
Pozn. ** ve zkumavce 3 krev ředěnou 1 : 50 povařte 5 min ve vroucí vodní lázni a ochlaďte*

	1	**2**	**3**
Ředěná krev 1 : 50	1 ml	1 ml	-
Povařená ředěná krev 1 : 50			1 ml*
KCN 10 g/l (jed)	-	0,25 ml	-
Deionizovaná H_2O	0,25 ml		0,25 ml
H_2O_2	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Vyhodnocení:

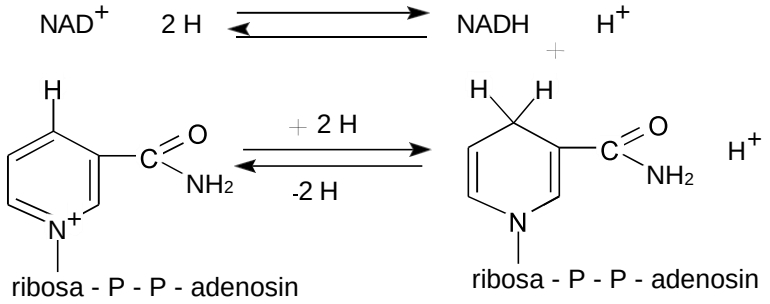
Porovnejte výsledek ve zkumavce č. 1 s výsledky ve zkumavkách č. 2 a 3, proveďte rozbor pokusu a vysvětlete.

4. Stanovení katalytické aktivity laktátdehydrogenázy v séru Warburgovým optickým testem.

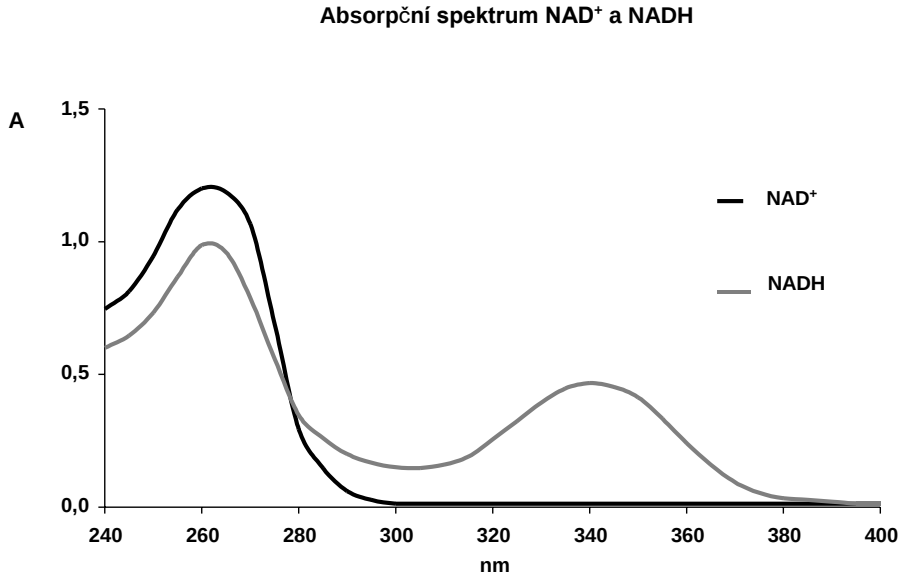
Princip:

Nikotinamidadenindinukleotid, zkráceně NAD, je koenzym skládající se z nikotinamidu, adeninu, dvou molekul ribózy a dvou fosfátů, jež jsou navzájem propojeny jako nukleotidy (adenosindifosfát, na nějž je navázána ribóza a na ní nikotinamid).

V buňce se NAD účastní oxidoredukčních reakcí, je koenzymem oxidoreduktáz. Koenzym se vyskytuje ve dvou formách: NAD^+ je oxidovaná forma, která přijímá elektrony z jiných molekul a sama se redukuje. Tak vzniká NADH + H^+, který poskytuje elektrony a sám se oxiduje. Tento přenos elektronů je hlavní funkcí NAD^+.



Reverzibilní hydrogenace nikotinamidadenindinukleotidu, která nastává na pyridinovém kruhu nikotinamidu, vytváří redukovanou formu a je provázena výraznou změnou absorpčního spektra. Oxidovaná forma (NAD^+) má absorpční maximum při vlnové délce 260 nm. Redukcí je zrušen aromatický charakter pyridinového jádra a jeho přechod v chinoidní formu ($NADH + H^+$) je provázen vznikem dalšího absorpčního maxima při 340 nm. Toto maximum se využívá pro stanovení koncentrace koenzymu v reakční směsi.



Používané molové absorpční koeficienty jsou

při 340 nm	$6{,}22 \cdot 10^3\ l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$
při 365 nm	$3{,}41 \cdot 10^3\ l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Můžeme připravit reakční směs z enzymu např. laktátdehydrogenázy (LD, EC 1.1.1.27), koenzymu (NADH) a příslušného substrátu (pyruvát) a za optimálních podmínek zjišťovat reakční rychlost měřením změn absorbance NADH při vlnové délce 340, popř. 365 nm.

$$CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + NAD^+ \longleftrightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + NADH + H^+$$

laktát pyruvát

Aktivita enzymu se projeví v kyvetě spektrofotometru s UV-zdrojem, která obsahuje reakční směs s enzymem, substrátem a NADH, plynulým poklesem absorbance při 340 nm. Záznam absorbance v čase by při nadbytku obou substrátů měl mít podobu klesající přímky (kinetika nultého řádu).

Při znalosti molárního absorpčního koeficientu NADH při této vlnové délce a přepočtu na ředění a časový interval jedné sekundy je možné vyjádřit aktivitu LD v séru v µkat/l. Není-li k dispozici kontinuální měření absorbance v čase, je možné provádět měření v kyvetě s reakční směsí diskontinuálně, např. měřením poklesu absorbance při 340 nm v intervalech po 1 minutě ($\Delta A_{340\ nm}$), a přepočíst na interval 1 s.

Reagencie:
(2023 – provedena aktualizace – jiné složení činidel – Fialová L.)

1) Činidlo 1: N-Methyl D-glukamin 406 mmol/l
2) Činidlo 2: N-Methyl D-glukamin 406 mmol/l
L-laktát 62,5 mmol/l
3) Činidlo 3: NAD^+ 50 mmol/l
4)
5) Sérum

Postup:

a. Kyvety a roztoky jsou vytemperovány na 37 °C
b. Do kyvety připravte slepý vzorek: 800 µl činidla 2 (pufr a L-laktát)
200 µl činidla 1 (pufr)
20 µl séra.
c. Promíchejte.
d. Podle pracovního návodu pro spektrofotometr Lightwave II+ nastavte měření A při vlnové délce 340 nm (**Lightwave II+ - zjednodušený návod**).
e. Vynulujte fotometr na slepý vzorek.
f. Do druhé kyvety napipetujte: 800 µl činidla 2 (pufr a L-laktát)
200 µl činidlo 3 (NAD^+)
20 µl séra.
g. Dobře promíchejte a přesně za 1 minutu změřte A pro vlnovou délku 340 nm a zapište do tabulky.
h. Měření opakujte ještě 5× **v přesně jednominutových intervalech,** absorbance pro zadané vlnové délky zapište do tabulky.
i. Přesvědčte se, že naměřená data sledují kinetiku nultého řádu: vyneste změřené hodnoty A_{340} do grafu jako závislost absorbance na čase.
j. Z naměřených hodnot absorbance A_{340} vypočítejte rozdíly absorbance za minutu (ΔA_{340}) a z rozdílů absorbance určete průměrnou hodnotu. Získanou průměrnou hodnotu ΔA_{340} použijte pro výpočet katalytické aktivity LD vztažené na 1 l neředěného séra a interval 1 s při aplikaci molárního absorpčního koeficientu koenzymu NADH pro 340 nm:

$$LD\ (\mu kat/l) = \Delta A_{340} \cdot 136{,}7$$

Vysvětlení výpočtu:

Při výpočtu enzymové aktivity vycházíme z **Lambert-Beerova zákona:**

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c \qquad (1)$$

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \qquad \Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot d} \qquad (2)$$

Předpokladem stanovení enzymové aktivity je zachování kinetiky nultého řádu, tj. průběh reakce je lineární (úbytek substrátu nebo přírůstek produktu za jednotku času je konstantní).

Při kinetických stanoveních enzymové aktivity přepočítáme změnu koncentrace substrátu nebo NADH ($mol \cdot l^{-1}$) na časový interval 1 s a objem 1 l neředěného séra.

$$\text{katalytická aktivita enzymu} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{V}{v} \cdot 10^6 \quad \mu mol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1} \qquad (3)$$

Pro změnu koncentrace použijeme výraz z rovnice 2, 1/60 je přepočet z minuty na sekundy a V/v vyjadřuje ředění séra. Jednotkou enzymové aktivity je kat = $mol \cdot s^{-1}$. V klinicko-biochemických stanoveních se používají μkataly (1 kat = 10^6μkat).

Při stanovení konkrétního enzymu, v našem případě laktátdehydrogenázy dosadíme do rovnice 3 resp. 4 konkrétní údaje.

$$\text{katalytická aktivita LD} = \frac{\Delta A_{340}}{\varepsilon \times d} \cdot \frac{1}{60} \cdot \frac{V}{v} \cdot 10^6 \quad \mu mol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1} \qquad (4)$$

$$\text{katalytická aktivita LD} = \frac{\Delta A_{340} \cdot 1{,}02 \cdot 10^{-3} \cdot 10^6}{6{,}22 \cdot 10^3 \cdot 60 \cdot 0{,}02 \cdot 10^{-3}} \quad \mu mol \cdot l^{-1} \cdot s^{-1} \qquad (5)$$

$$\text{katalytická aktivita LD} = \Delta A_{340} \cdot 136{,}7 \quad \mu kat \cdot l^{-1} \qquad (6)$$

symbol		**jednotka**	konkrétní údaje pro LD a použitou metodu
V	celkový objem vzorku v kyvetě	l	**$1{,}02 \cdot 10^{-3}$**
v	objem přidaného séra	l	**$0{,}02 \cdot 10^{-3}$**
ε	molární absorpční koeficient (pro NADH při 340 nm)	$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$	**$6{,}22 \cdot 10^3$**
d	šířka vrstvy v kyvetě	cm	1
10^6	převod z mol na μmol		10^6
60	převod z min na sec		60

Pozn. *první tři údaje (vytištěné tučně) se mění se stanovovaným enzymem a použitou metodou, další tři - šířka vrstvy v kyvetě, převod z mol na μmol, převod z min na sec jsou zpravidla stejná*

pro všechna kinetická stanovení enzymových aktivit stanovovaných Warburgovým optickým testem.

Referenční hodnoty LD v séru (37 ^{0}C): 2,9 – 8,6 μkat