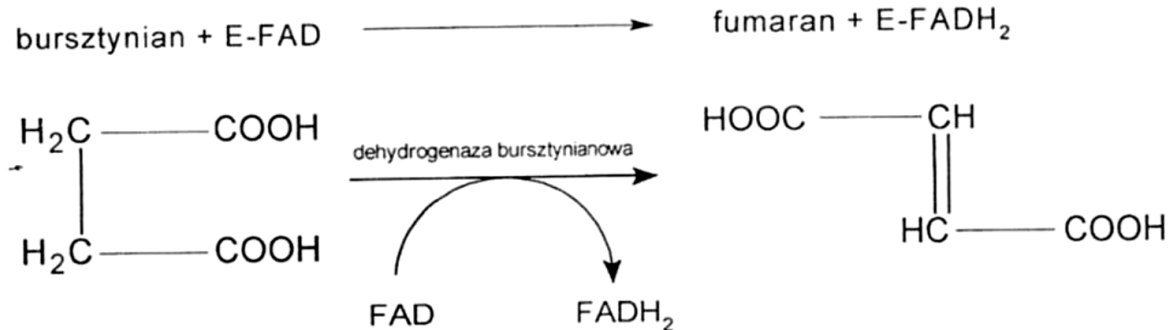


Ćwiczenie 3. Ocena aktywności metabolicznej mitochondriów

Dehydrogenaza bursztynianowa utlenia bursztynian do fumaranu wg poniższej reakcji:



Jest to jeden z enzymów biorących udział w cyklu kwasu cytrynowego (CKC). W reakcji tej FADH_2 nie ulega ponownemu utlenieniu pod wpływem tlenu. Może to nastąpić jedynie pod wpływem cytochromów, bądź barwników o wyższym potencjale oksydo-redukcyjnym, jak np. dichlorofenoloindofenol (DCPIP) lub $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

DOŚWIADCZENIE 1.

Eksperymentalna ocena wpływu malonianu, glutaminianu oraz szczawiooctanu na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej.

W doświadczeniu tym sztucznym akceptorem elektronów jest sześciocyjanożelazian potasu, gdzie redukcja $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ prowadzi do zmniejszenia absorbancji przy długości fali 420 nm (VIS).

Kwas malonowy i kwas szczawiooctowy są inhibitorami kompetycyjnymi dehydrogenazy bursztynianowej. Jedną z możliwości zahamowania aktywności szczawiooctanu jest dodanie do próby glutaminianu, który w reakcji transaminacji usuwać będzie szczawiooctan.

Opis wykonania:

1. Przygotować mieszaninę substratową W o następującym składzie:

0.8 M bufor fosforanowy pH 7.4	0,5 ml
6 mM CaCl_2	0,8 ml
1.32 mM KCN	2,0 ml
0.4 M bursztynian sodu	1,0 ml
72 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	0,8 ml
0.9% NaCl	2,8 ml
Woda bidestylowana	2,0 ml

Mieszanina wystarczy do wykonania 6 pomiarów + 10% nadmiaru.

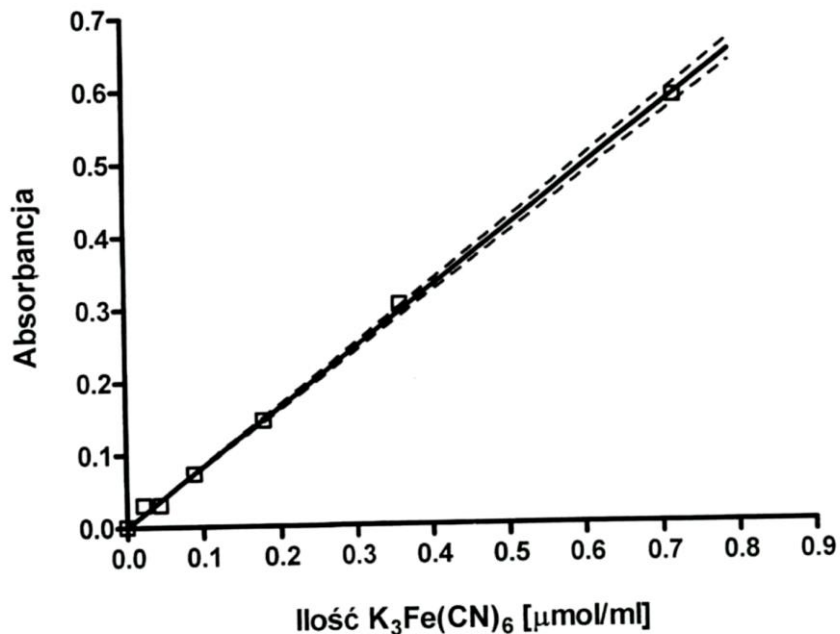
2. Przygotować 6 próbek wg poniższej tabeli:

Odczynnik [ml]	Probówka nr:					
	1	2	3	4	5	6
Woda bidestylowana	0,5	0,4	0,2	0,1	0,3	1,0
Mieszanina substratowa W	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Szczawiooctan	-	0,1	-	0,1	-	-
Glutaminian	-	-	0,3	0,3	-	-
Malonian	-	-	-	-	0,2	-
Fracja mitochondrialna	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-

3. Probówki zworteksować, a następnie inkubować 60 minut w temp. 37°C.
4. Po upływie czasu inkubacji – przerwać reakcję poprzez dodanie po 1 ml 20% kwasu nadchlorowego do każdej z próbek. Probówki zworteksować i odstawić na 15 minut.
5. Przebrać zawartość poszczególnych próbek do plastikowych próbek wirówkowych i zwirować przez 15 min. przy prędkości 2000 RPM.
6. Wyzerować spektrofotometr wobec wody (420 nm), a następnie zmierzyć wartość absorbancji dla próbek 1-6, pobierając po 1,5 ml supernatantu z plastikowych próbek bezpośrednio do kuwety pomiarowej (pipeta automatyczna). Probówka nr 6 zawiera próbę odczynnikową, dla której w przypadku zastosowanej reakcji wartość absorbancji powinna być najwyższa (brak odbarwienia roztworu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$).
7. Dokonać obliczeń zawartości $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ w poszczególnych próbach, korzystając z krzywej wzorcowej dla $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (strona 3). Aktywność enzymatyczną oblicza się z różnicy zawartości $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ między próbą odczynnikową (probówka 6) a próbą badaną (probówki 1-5), przeliczając wynik na 1 minutę trwającej reakcji enzymatycznej.

$$\text{Aktywność enzymatyczna} = (C_6 - C_x) / 60 \text{ } [\mu\text{mol/ml/min}]$$

Krzywa wzorcowa roztworu wodnego $K_3Fe(CN)_6$



$$C_x (K_3Fe(CN)_6) = A_x / 0,8175$$

DOŚWIADCZENIE 2.

Oznaczanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) w mitochondriach izolowanych z wątroby szczura oraz frakcji cytoplazmatycznej.

W przypadku białek enzymatycznych samo oznaczenie stężenia preparatu nie jest wystarczające dla oceny jego jakości. Miarą użyteczności biochemicznej enzymu jest jego aktywność, czyli zdolność badanego enzymu do przekształcenia określonej ilości substratu w produkt reakcji w jednostce czasu. Stąd mierzyć można zarówno ubytek substratu, jak i przyrost produktu reakcji enzymatycznej, która przebiegać powinna w odpowiednich warunkach m.in. temperatury, pH oraz obecności kofaktorów. Tak opisaną aktywność określa się mianem aktywności bezwzględnej, którą wyraża się zazwyczaj w $\mu\text{mol/min}$. Ze względu na różną zawartość białek balastowych w analizowanych preparatach dla celów analitycznych zaleca się stosowanie aktywności właściwej. Uzyskać ją można po obliczeniu aktywności bezwzględnej podzielonej przez stężenie białka w badanym preparacie enzymatycznym i wyraża się jako $\mu\text{mol/min/mg}$ białka.

Jedną z najpopularniejszych metod oznaczania stężenia białka w preparacie biologicznym jest tzw. metoda Lowry – czuła reakcja odczynnika Folina-Ciocalteu z wiązaniami peptydowymi i aminokwasami aromatycznymi. Oparta jest ona na zjawisku redukcji miedzi Cu^{2+} do Cu^+ , a następnie redukcji przez jony miedzi i aromatyczne aminokwasy w strukturze białka kwasów fosforowolframowego i fosfomolibdenowego do odpowiednich tlenków, czemu towarzyszy zmiana zabarwienia roztworu mierzona przy długości fali 750 nm (VIS). Ze względu na dużą czułość metody konieczne jest odpowiednie rozcieńczenie badanych próbek. Dla badanych frakcji mitochondrialnych zaleca się rozcieńczenie 200-krotne.

Oznaczenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej

W metodzie tej wykorzystuje się zmianę absorpcji światła podczas redukcji sztucznego akceptora elektronów – 2,6-dichlorofenoloindofenolu (DCIP). W formie utlenionej związek ten wykazuje maksimum absorpcji przy 600 nm. W reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę bursztynianową powstaje $FADH_2$, który z kolei redukuje DCIP, powodując zanik absorpcji przy ww. długości fali. Kinetyczny pomiar zmian absorpcji mierzony spektrofotometrycznie jest miarą aktywności dehydrogenazy bursztynianowej.

W celu zahamowania równoczesnego utleniania DCIP przez łańcuch oddechowy, reakcję prowadzi się w obecności KCN – inhibitora oksydazy cytochromowej

Wykonanie:

1. Przygotować mieszaninę substratową D o następującym składzie:

0,2 M bufor fosforanowy	10 ml
6 mM Na_2EDTA	1 ml
0,4 M bursztynian sodu	1 ml
0,35 mM DCIP	2 ml
20 mM KCN	1 ml

Mieszanina wystarczy do wykonania 6 pomiarów + nadmiar 3 ml.

2. Wyzerować spektrofotometr (600 nm) stosując 2 ml mieszaniny substratowej D. Nie wylewać mieszaniny z kuwety!
3. Pozostawiając kuwetę w spektrofotometrze dodać 50 μ l nierozcieńczonej (uprzednio wymieszanej) frakcji mitochondrialnej, intensywnie wymieszać zawartość kuwety okrężnym ruchem końcówki pipety, rozpoczynając od dołu kuwety (przez około 3 sekundy).
4. Zamknąć pokrywę spektrofotometru i zapisać wartość absorpcji ($t = 0$ min.)
5. Po upływie 60 sekund ponownie odczytać wartość absorpcji ($t = 1$ min.)
6. Wykonać dwa kolejne powtórzenia dla frakcji mitochondrialnej wg pkt. 2-5. Do obliczeń użyć średnią wartość zmiany absorpcji w ciągu minuty z trzech pomiarów.
7. Wykonać analogiczne 3 pomiary dla frakcji cytoplazmatycznej.
8. Dokonać obliczeń aktywności właściwej dla poszczególnych frakcji i porównać wyniki.

$$\text{Aktywność właściwa} = \frac{\Delta A_{600}}{10.5 \times W}$$

ΔA_{600} – średnia wartość różnic absorpcji dla badanej frakcji

10,5 – wartość wynikająca z molowej absorpcji DCIP

W – ilość białka w badanej próbce (50 μ l) – należy obliczyć na podstawie otrzymanego stężenia białka w 1 ml próby

Wynik analizy podaje się w mikromolach bursztynianu utlenionego w ciągu jednej minuty przez 1 mg białka [μ mol/min/mg białka].

Zagadnienia teoretyczne do przygotowania:

1. Informacje teoretyczne z niniejszego opracowania.
2. Pojęcie bezwzględnej oraz właściwej aktywności enzymatycznej.
3. Mitochondria – budowa i funkcje.
4. Przebieg cyklu kwasu cytrynowego (CKC) z uwzględnieniem kompleksów enzymatycznych biorących udział w poszczególnych reakcjach cyklu.
5. Przenośniki elektronów biorące udział w CKC i zysk energetyczny pełnego cyklu.
6. Regulacja aktywności CKC.
7. Podstawowe pojęcia nt. łańcucha oddechowego – struktura, przebiegające procesy (fosforylacja oksydacyjna).

ZALECANA LITERATURA

- J.M. Berg, J.L. Tomoczko, L. Stryer Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN