

Dátum:
7.4.2007

Izolácia alkoholdehydrogenázy z hrachu

Anton Repko
BCHPV/2

Úvod

Alkoholdehydrogenáza (EC 1.1.1.1) katalyzuje redoxnú rovnováhu etanolu a acetaldehydu za prítomnosti NAD^+ . Tento enzým som extrahoval z klíčiacych semien hrachu fosfátovým pufróm a získal frakciu zrážajúcu sa medzi 35% a 60% nasýtením roztoku síranu amónneho.

Množstvo enzýmu som zistil Lowryho metódou, využívajúcou Folinovo fenolové činidlo, ktoré poskytuje s tyrozylóvymi zbytkami bielkovín modrofialové zafarbenie, ktoré sa meria spektrofotometricky pri 500 nm.

Aktivitu som stanovil na základe absorpcie svetla vlnovej dĺžky 340 nm redukovanou formou koenzýmu - NADH a vypočítal podľa vzorca:

$$a = 1000 \cdot \frac{\Delta A_{340} V_{\text{celk}}}{\varepsilon l V_{\text{enz}} \Delta t} \quad (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1})$$

Aparatúra

20 g semien hrachu napučaných vo vode 3 dni, mixér, kadičky

chladená centrifúga °C na 2000 g, automatická pipeta

0,1 M fosfátový pufr pH 8,5 s 5 mM merkaptóetanolu

20 mM Tris-acetátový pufr pH 6,5 s 5 mM merkaptóetanolu

síran amónny, 10 mM NAD^+ , 1 M etanol

Lowryho metóda: Folinovo fenolové činidlo, 2% Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH, 0,5% CuSO_4 v 1% $(\text{CHOHCOO})_2\text{Na}_2$

Postup

Naklíčené semená hrachu som homogenizoval s 100 ml vychladeného fosfátového pufru. Získanú suspenziu som prefiltraval cez 3 vrstvy gázy a centrifugoval 15 minút. Supernatant som zliat (103 ml) a pridal k nemu za miešania 21,5 g práškoveho $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, čím vznikol roztok nasýtený na 35%. Po 30 minútach státia som roztok centrifugoval 15 minút, supernatant som zliat (102 ml) a pridal k nemu za miešania 16,7 g práškoveho $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, čím som získal roztok nasýtený na 60%. Po 30 minútach státia som roztok centrifugoval 15 minút, oddelil sediment obsahujúci ADH a rozpustil ho v 5 ml Tris-acetátového pufru (enzýmový preparát 1:1). Zo získaného roztoku som odobral 1 ml a zriedil na 10 ml (roztok 1:10).

Lowryho metóda

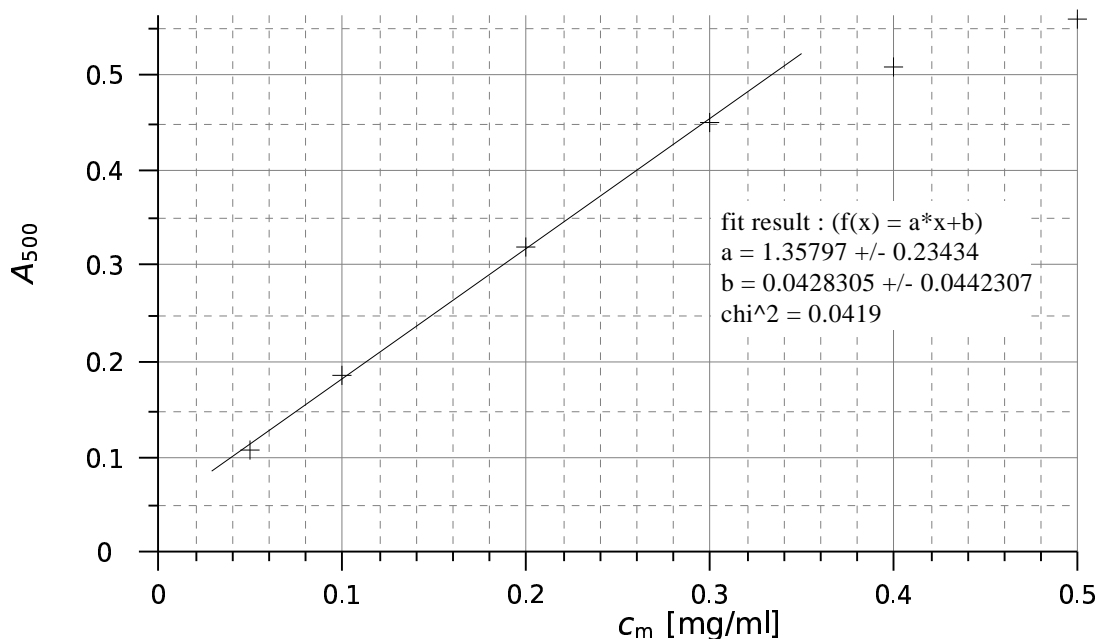
Pripravil som roztok C zmiešaním 20 ml roztoku 2% Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH a 0,4 ml 0,5% CuSO_4 v 1% $(\text{CHOHCOO})_2\text{Na}_2$. Z 1:10 roztoku som odobral do dvoch skúmaviek po 0,02 ml a 0,03 ml a doplnil vodou na 1 ml (roztoky 1:500 a 1:333). Ako slepá vzorka slúžila skúmavka s 1 ml vody. K týmto roztokom som pridal po 5 ml roztoku C, zamiešal, nechal stáť 10 minút, pridal po 0,5 ml Folinovho činidla, rýchlo premiešal a nechal stáť 30 minút. Potom som zmeral absorbanciu jednotlivých roztokov pri 500 nm proti nulovaciemu roztoku.

Stanovenie aktivity

Pripravil som roztok 1:100 zriedením 1 ml roztoku 1:10 na 10 ml vodou. Do kyvety spektrofotometra som napipetoval roztoky: 0,3 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 8,5, 0,1 ml 10 mM NAD^+ , 0,2 ml 1 M etanolu a 1,8 ml destilovanej vody. Ďalej som rýchlo pridal 0,1 ml roztoku 1:100, premiešal a meral absorbanciu pri 340 nm v 15 sekundových intervaloch.

Výsledky

Kalibračná priamka Lowryho metódy



Absorbancia roztoku 1:500 bola 0,236, čo odpovedá 0,142 mg/ml, t.j. 71 mg/ml 1:1

Absorbancia roztoku 1:333 bola 0,365, čo odpovedá 0,237 mg/ml, t.j. 79 mg/ml 1:1

Priemer: 75 mg proteínov na 1 ml enzýmového preparátu

Absorbancie počas prebiehajúcej reakcie:

t [min]	A_{340}	ΔA_{340}
0,00	0,000	
0,25	0,017	0,017
0,50	0,035	0,018
0,75	0,052	0,017
1,00	0,069	0,017
1,25	0,085	0,016
1,50	0,100	0,015
1,75	0,113	0,013
2,00	0,127	0,014
2,25	0,140	0,013
2,50	0,152	0,012
2,75	0,164	0,012
3,00	0,175	0,011

Priemer zo začiatku merania je $\Delta A = 0,017$ za $\Delta t = 0,25$ s.

Aktivita enzýmového preparátu je:

$$a = 1000 \cdot \frac{0,017 \cdot 2,5}{6,3 \cdot 1 \cdot 0,001 \cdot 0,25} = 27000 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Na 1 mg proteínu podľa Lowryho to dáva $360 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, čo odpovedá hodnote uvedenej v katalógu enzýmov.

Odpovede na kontrolné otázky

1. Dialýza prebieha pri pH 6,5, aby nedochádzalo k uvoľňovaniu amoniaku z prítomného síranu amónneho, meranie aktivity zasa pri pH 8,5 kde má enzým najvyššiu aktivitu.
2. Systematické názvy enzýmov:
 izocitrát dehydrogenáza (EC 1.1.1.41) - izocitrát: NAD^+ oxidoreduktáza (dekarboxylujúca)
 sukcinát dehydrogenáza (EC 1.3.5.1) - sukcinát: ubiquinón oxidoreduktáza
 malát dehydrogenáza (EC 1.1.1.37) - (S)-malát: NAD^+ oxidoreduktáza