



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Wyznaczanie aktywności właściwej pleśniowej β -galaktozydazy

Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu
Biotechnologia

Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna

Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

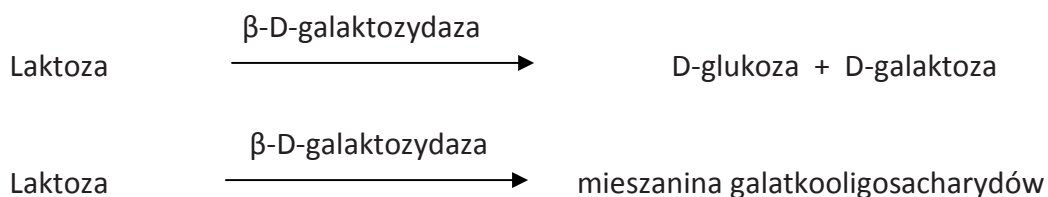
CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie aktywności właściwej wieloenzymatycznych preparatów *Aspergillus Niger* poprzez badanie reakcji preparatu wobec syntetycznego substratu ONPG oraz określenie stężenia białka w w/w preparatach.

PODSTAWY TEORETYCZNE

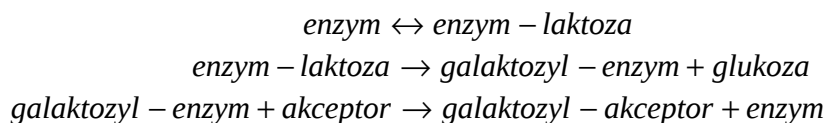
β -D-galaktozydaza

β -D-galaktozydaza (EC 3.2.1.23) jest enzymem należącym do klasy hydrolaz, katalizującym reakcję hydrolizy wiązań O-glikozydowych w β -D-galaktozydach. Najbardziej znanym galaktozydem jest disacharyd występujący w mleku – laktoza. Katalizowana enzymatycznie reakcja hydrolizy wiązania β -1,4-glikozydowego w laktozie prowadzi do powstania cząsteczek D-glukozy i D-galaktozy. Niektóre β -D-galaktozydazy wykazują również zdolność syntezy wiązań glikozydowych, która prowadzi do powstania łańcucha oligosacharydowego, gdy substratem reakcji jest laktoza (Schemat 1).



Schemat 1

Obie aktywności β -D-galaktozydazy – hydrolityczna i transferazowa są ze sobą nierozzerwalnie związane, a ich mechanizm jest wspólny. Obejmuje on trzy następujące po sobie etapy, a ostatni z nich decyduje, czy zachodzi reakcja hydrolizy czy transglikozylacji (Schemat 2).



Schemat 2

W pierwszym etapie następuje wiązanie cząsteczki laktozy w centrum aktywnym β -D-galaktozydazy. Drugi etap obejmuje rozszczepienie disacharydu z udziałem reszt aminokwasowych enzymu o znaczeniu katalitycznym. Cząsteczka glukozy opuszcza wnękę katalityczną, zaś reszta galaktozylowa pozostaje związana z enzymem. W ostatnim etapie następuje przeniesienie reszty galaktozylowej na cząsteczkę akceptora i produkt reakcji opuszcza centrum aktywne β -D-galaktozydazy. Jeżeli akceptorem jest woda, uwolniona zostaje cząsteczka D-galaktozy. Jeżeli zaś rolę akceptora pełni cząsteczka cukru (laktoza lub jeden z produktów jej hydrolizy), powstaje galaktooligosacharyd. Reakcją preferowaną przez β -D-galaktozydazy jest na ogół reakcja hydrolizy. W celu zwiększenia efektywności reakcji

transglikozylacji należy zwiększyć stężenie akceptora lub zastosować niskowodne środowisko reakcji. Wykazano, że akceptorem w reakcji transglikozylacji może być nie tylko cząsteczka cukru, ale również alkoholu, antybiotyku lub pochodna aminokwasu. Dzięki temu β -D-galaktozydazy mogą znaleźć zastosowanie przy produkcji farmaceutyków i innych związków biologicznie czynnych.

Pochodzenie enzymu

β -D-galaktozydaza jest enzymem syntetyzowanym przez komórki ssaków, roślin, drożdży, grzybów strzępkowych i bakterii. W zależności od źródła pochodzenia, enzymy różnią się masą cząsteczkową, liczbą podjednostek wchodzących w skład natywnej cząsteczki, wartościami optymalnej temperatury i pH działania, a także zapotrzebowaniem na jony metali niezbędne dla aktywności enzymu, czy stabilizacji jego struktury. β -D-galaktozydazy różnią się również spektrum substratowym, wrażliwością na działanie inhibitorów i aktywatorów oraz termostabilnością. Najbogatszym źródłem β -D-galaktoydaz o zróżnicowanych właściwościach są mikroorganizmy. Niektóre z nich zdolne są do syntezy kilku różnych β -D-galaktoydaz, np. *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 wytwarza dwa enzymy, zaś z *Bacillus circulans* wyizolowano aż trzy różne β -D-galaktozydazy. Poniżej przedstawiono tabelę zawierającą przykładowe źródła pochodzenia enzymu β -D-galaktozydazy (Tabela 1).

Źródła β -galaktoydaz ¹		
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Penicilium chrysogenum</i>
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Corynebacterium murisepticum</i>	<i>Penicilium citrinum</i>
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Rhizomucor sp.</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Saccharomyces fragilis</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Trioderma viride</i>

Tabela 1

Wyznaczanie aktywności enzymu

W celu ilościowego oznaczenia aktywności katalitycznej enzymu stosowane są reakcje wobec charakterystycznych substratów w określonych warunkach w celu unifikacji tychże oznaczeń, których mierzalny ilościowo produkt po dokonaniu odpowiednich obliczeń, zostaje przekształcony do przyjętych jednostek aktywności katalitycznej.

¹ <http://www.brenda-enzymes.info/> - Enzyme Database - BRENDA

Jednostką aktywności enzymów wprowadzoną w 1964 przez Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej, zdefiniowana przez Komisję Enzymową w 1961 roku jest jeden U (Unit). To ilość enzymu katalizująca przemianę 1 μ mola substratu w czasie 1 minuty. Zwykle przyjmuje się określone warunki: temperaturę odpowiadającą optymalnej dla danego enzymu, dane pH i maksymalne wysycenie enzymu substratem.

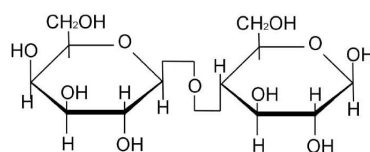
Ponieważ minuta nie jest jednostką SI, do określania aktywności enzymów zaleca się stosowanie katala definiowanego jako aktywność enzymu umożliwiającą przekształcenie 1 mola substratu w czasie 1 sekundy. Ze względu na użyteczność. Ponieważ katal w porównaniu do U jest jednostką bardzo dużą, powszechnie używa się mikro- i nanokatali. Jakkolwiek w biochemii i podobnych naukach wciąż używa się U. Poniżej przedstawiona została zależność pomiędzy obiema jednostkami (Schemat 3).

$$1 \text{ U} = 1/60 \text{ } \mu\text{katala} = 16,67 \text{ nanokatala}.$$

Schemat 3

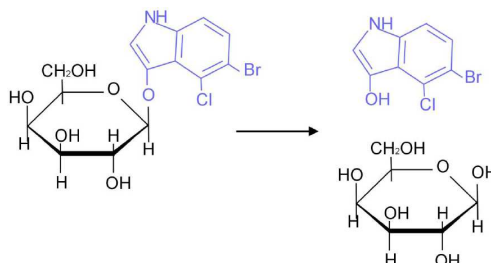
β -galaktozydaza, oprócz hydrolizy wiązania glikozydowego w swoim naturalnym substracie, hydrolizuje także syntetyczne chromogenne substraty. Poniżej zostały wymienione substraty stosowane do badania β -galaktozydazy

- laktoza (4-O- β -D-galaktopiranozylo-D-glukopiranozie, (Schemat 4);



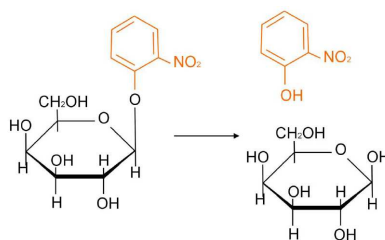
Schemat 4

- bezbarwny 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd (X-Gal), dając 5-bromo-4-chloro-3-hydroksyindol i galaktozę, z których ten pierwszy, ulega dalej przekształceniom w niebieski barwnik będący pochodną indygo, (Schemat 5);



Schemat 5

- bezbarwny o-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozyd (ONPG), uwalniając żółty o-nitrofenol i galaktozę (Schemat 6);



Schemat 6

X-Gal na ogół używany jest przy badaniach aktywności β -galaktozydazy *in vivo* (np. kolonie bakteryjne rosnące na pożywce stałej), natomiast laktoza podobnie jak ONPG, stosowane są w badaniach *in vitro* wyznaczając ilościowo aktywność katalityczną enzymu.

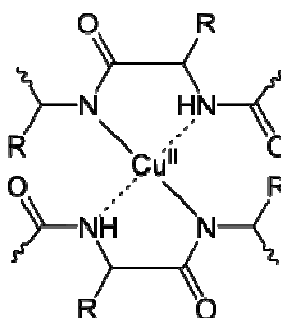
Najważniejszą cechą testu aktywności enzymatycznej jest, poza jego powtarzalnością, prosta i szybka technika ilościowego oznaczania koncentracji powstającego produktu reakcji. Stąd też powszechnie stosowane techniki to: miareczkowanie, oznaczanie ilościowe produktu metodami spektrofotometrycznymi, bądź w przypadku braku odpowiedniej grupy chromoforowej przekształcenie produktów reakcji do produktów posiadających ugrupowanie chromoforowi mierzalne w zakresie UV-Vis.

Oznaczanie ilościowe białka

Oznaczanie ilościowe białka w próbce może zostać przeprowadzone z użyciem różnych metod. Najczęściej stosowanymi metodami są metody kolorymetryczne takie jak:

- metoda biuretowa
- metoda Lowry'ego
- metoda Bradforda
- a także przez pomiar absorbancji w nadfiolecie

Metoda biuretowa opiera się na charakterystycznej reakcji chemicznej pozwalającej wykryć wiązania peptydowe w rozmaitych związkach organicznych, głównie białkach, peptydach. Warunkiem koniecznym dla pozytywnego wyniku próby jest występowanie co najmniej dwóch wiązań peptydowych bezpośrednio obok siebie lub przedzielonych nie więcej niż jednym atomem węgla. Nazwa testu pochodzi od najprostszego związku, który ulega tej reakcji, a mianowicie biuretu - dimeru mocznika ($\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$), (Schemat 7).



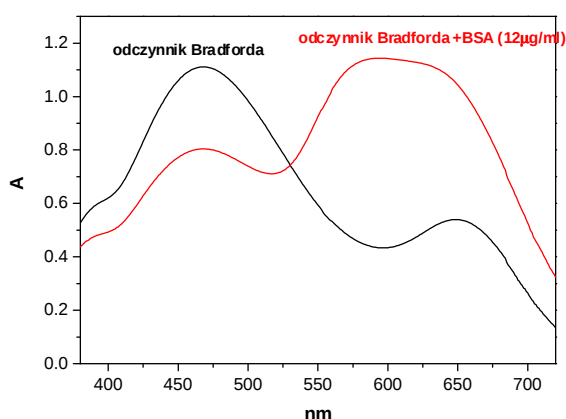
Schemat 7

Poprzez dodanie do roztworu silnej zasady jak NaOH lub KOH oraz siarczanu miedzi(II). Obecność związków zawierających wiązania peptydowe przejawia się zmianą koloru roztworu z niebieskiej na fioletową ($\lambda_{\text{max}}=505\text{nm}$). Związane jest to z powstawaniem anionowych związków kompleksowych, w których jon Cu^{2+} jest kompleksowany przez

minimum dwie grupy peptydowe co widoczne jest na powyższym schemacie. Test powszechnie stosowany jest zarówno w analizie jakościowej, jak i ilościowej, przy czym w drugim przypadku konieczne jest wyznaczenie liniowej zależności zmiany barwy od stężenia białka, co jest typowym w tego typu analizach.

Metoda Lowry’ego opiera się na połączeniu reakcji biuretowej oraz reakcji Folina-Ciocalteu. Wiązania peptydowe białek reagują z jonami miedzi w warunkach alkalicznych, tworząc kompleks, a drugą reakcją jest redukcja kwasów fosforowolframowego i fosfomolibdenowego (odczynnik Folina-Ciocalteu) do odpowiednich tlenków przez oksydację aminokwasów aromatycznych [tyrozyna, tryptofan] katalizowaną przez jony Cu^+ związane z białkiem. Powstające produkty reakcji mają intensywną niebieską barwę i mogą być oznaczane ilościowo kolorymetrycznie ($\lambda_{\text{max}}=660\text{nm}$).

Metoda Bradforda wykorzystuje zdolność wiązania barwnika błękitu brylantowego Coomassie G-250 (ang. *Coomassie Brilliant Blue*) z białkiem. W środowisku kwaśnym widmo absorpcji barwnika charakteryzuje się maksimum przy 465 nm, natomiast po związaniu białka maksimum przesuwa się w stronę fal dłuższych i występuje przy 595 nm. Mając wyznaczoną krzywą kalibracyjną dla wzorcowego białka (np. BSA, IgG) można określać zawartość białka w badanej próbce poprzez pomiar zmiany absorbancji w 595 nm roztworu barwnika po dodaniu do niego badanej próbki. Poniżej przedstawiono wykresy absorpcji odczynnika Bradforda przed i po dodaniu białka (Schemat 8).



Schemat 8

Ostatnia wymieniona technika opiera się na bezpośrednim pomiarze spektrofotometrycznym badanej próbki przy długości fali 280nm. Jest to szybka metoda analizy zawartości białek, jednak ze względu na jej ograniczenia związane z dużym oddziaływaniem matrycy, stosowana jest głównie przy ocenie czystości DNA – $\lambda_{\text{max}}=260\text{nm}$.

PRZEBIEG ĆWICZENIA

Oznaczanie aktywności wobec syntetycznego substratu ONPG

Odczynniki:

- wielobiałkowy preparat grzybowej β -galaktozydazy
- 400mM bufor cytrynianowy o pH=4.0
- 200mM bufor boranowy o pH=9.8

- 10mM *o*-Nitrofenylo- β -D-galaktopiranozyd (ONPG)

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- Probówki (60szt.)
- Statywy (4szt.)
- Spektrofotometr UV-Vis
- Łaźnia wodna
- Pipety automatyczne

Wykonanie ćwiczenia

1. Etap - Wykonanie rozcieńczeń

Należy wykonać serię rozcieńczeń otrzymanego od prowadzącego preparatu enzymatycznego uzyskując:

- roztwór wyjściowy,
- 10-krotnie rozcieńczony;
- 100- krotnie rozcieńczony;
- 1000- krotnie rozcieńczony;

2. Etap - Wykonanie testu enzymatycznego

Test aktywności enzymatycznej należy przeprowadzić w 3 powtórzeniach dla każdego rozcieńczenia oraz 3 probówki kontrolne ($4 \times 3 = 12 + 3 = 15$) poprzez umieszczenie w 55°C w łaźni wodnej statywu z probówkami zawierającymi:

500 μL roztworu ONPG

400 μL buforu cytrynianowego.

Następnie po 5 minutach inkubacji w łaźni należy dodawać po 100 μL odpowiednio przygotowanego badanego preparatu odmierzając na stoperze czas 10 minut. Do próbki kontrolnej należy dodać 100 μL wody.

Po upływie 10 minut należy w tej samej kolejności co badany preparat dodawać po 3 mL buforu boranowego w celu zatrzymania reakcji enzymatycznej.

Następnie należy wyjąć statyw z łaźni.

Absorbancję próbek należy zmierzyć przy długości fali 410 nm, odpowiadającej maksimum absorpcji *o*-nitrofenolu będącego produktem reakcji hydrolizy, który daje żółte zabarwienie roztworu.

Oznaczenie ilościowe białek Metodą Lowry'ego

Odczynniki:

- A - 2% węglan sodu w 0.1M roztworze NaOH;
- B₁ - 1% siarczan miedzi(II);
- B₂ - 2% winian sodowo potasowy;
- C - mieszanina roztworów A, B₁ i B₂ w proporcjach 50:1:1;
- D - Odczynnik Folina –Ciocalteau;
- E - wielobiałkowy preparat grzybowej β -galaktozydazy

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (60szt.)
- statywy (4szt.)

- Spektrofotometr UV-Vis

Wykonanie ćwiczenia

1. Minimum 15 minut przed wykonaniem oznaczenia przygotować roztwór C.
2. Do probówek dodać po 0,5ml roztworu badanego E (przygotowanego do oznaczenia aktywności) po 3 powtórzenia dla każdego z rozcieńczeń oraz 2,5ml mieszaniny C i pozostawiono na 10 minut. Następnie dodać 0.25ml odczynnika D i energicznie mieszać. Po upływie 30 minut zmierzyć absorbancję próbek przy długości fali 750 nm.

PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ

1. Przeczytaj uważnie instrukcję i dokładnie przeanalizuj czynności oraz techniki laboratoryjne opisane w części eksperymentalnej.
2. Zapoznaj się z zagrożeniami związanymi z stosowanymi odczynnikami oraz poszczególnymi czynnościami wykonywanymi na zajęciach (karty charakterystyk).
2. Zwróć uwagę czy znasz następujące pojęcia: enzym, katal, unit, prawo Lamberta-Beera, absorbancja,
3. Zastanów się czy wiesz:
 - Jakie są źródła β -galaktozydazy?
 - Jakie charakterystyczne reakcje katalizowane są przez β -galaktozydazę?
 - Jak zachodzi reakcja w centrum aktywnym enzymu?
 - W jaki sposób wyznacza się aktywność katalityczną β -galaktozydazy?
 - Jakie są metody oznaczania ilości białek i na czym one polegają?

OPRACOWANIE WYNIKÓW

W celu opracowania sprawozdania należy:

- Napisać krótki wstęp teoretyczny
- Opisać przebieg wykonywanych czynności, z uwzględnieniem obserwacji dokonanych w trakcie prowadzenia doświadczeń
- Przedstawić w formie tabeli uzyskane wyniki pomiarowe wraz z uśrednionymi wartościami, które zostaną użyte do dalszych obliczeń,
- Niezbędne krzywe wzorcowe zostaną podane na zajęciach przez prowadzącego,
- Wyliczyć aktywność enzymatyczną preparatów korzystając z poniższego wzoru:

$$[U / mg] = \frac{\Delta A \cdot V}{T \cdot \xi \cdot B}$$

Gdzie: ΔA – Absorbancja ONP ($A_{\text{próbki}} - A_{\text{tła}}$)

V – objętość całkowita próbki

T – współczynnik konwersji czasu = 10

ξ – molowy współczynnik ekstynki = 4.6

B – stężenie białka [mg/ml]

Obliczenia aktywności katalitycznej należy obliczyć dla każdego z wykonanych rozcieńczeń oraz wybrać wynik obarczony najmniejszym błędem co poprzez stosownym komentarzem na podstawie znajomości Prawa Lamberta-Beera.

- Końcowe wyniki aktywności przedstawić w jednostkach:

- U/ml
- U/mg

oraz przeprowadzić dyskusję dotyczącą różnic i trudności w ocenie porównawczej preparatów enzymatycznych uwzględniając różnice pomiędzy aktywnością wyrażoną jako U/ml a aktywnością właściwą.

- Przedstawić stosowne wnioski wynikające z przeprowadzonych doświadczeń

LITERATURA

- J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2005)
- J. Witwicki, W. Ardełt, *Elementy enzymologii*, PWN Warszawa (1984)
- L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PPWN, Warszawa (2005)
- J. Gniot-Szulżycka, A. Leźnicki, B. Wojczuk *Materiały do ćwiczeń z biochemii. Białka. Metody ilościowego oznaczania, rozdziału i oczyszczania*, Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 2005
- C. Ratledge, B. Kristiansen, *Podstawy biotechnologii*, tłum. A.K. Kononowicz, S. Bielecki, A. Chmiel, PWN, Warszawa 2011
- Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, *Mikrobiologia techniczna. Tom 1*, PWN, Warszawa (2010)
- Chmiel, *Biotechnologia – podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa, 1998