

## INSTRUKCJA DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH

### „Izolacja enzymu”

**Tyrozynaza** (EC 1.14.18.1) jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w organizmach żywych. Obecność tego enzymu stwierdza się zarówno w mikroorganizmach, jak i komórkach roślinnych. W organizmach ssaków największą aktywność tyrozynazy wykrywa się w melanocytach, gdzie jest ona kluczowym enzymem szlaku syntezy melaniny.

Celem ćwiczenia jest uzyskanie enzymu **tyrozynazy** z trzech naturalnych źródeł: pieczarki, banana i ziemniaka.

#### Odczynniki i sprzęt:

1. 100 g świeżych pieczarek/bananów/ziemniaków
2. Lejek oraz bibuła filtracyjna
3. Mikser
4. Wirówka
5. Zlewki
6. Probówki typu eppendorf na 1.5 ml i typu Falcon na 15 ml
7. Nasycony  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4.1 M w 25° C)
8. 0.1 M buforu cytrynianowego o pH 4.8
9. 0.1 M NaF
10. Lód

#### **Wykonanie doświadczenia:**

##### *A. Otrzymywanie enzymu z preparatów roślinnych*

Banany i ziemniaki obrać, z kapeluszy pieczarek zdjąć skórę. Pokroić około 100 g pieczarek/banana/ziemniaka na drobne kawałki. Pokrojone pieczarki/banany/ziemniaki umieścić w mikserze i dokładnie rozdrobnić.

**\*UWAGA! dalsze czynności należy wykonywać w rękawiczkach ze względu na toksyczny NaF**

Wszystkie następne czynności wykonywać w temperaturze 2–4°C (w łaźni lodowej). Odważyć 10 g rozdrobnionej próbki. Przenieść do szklanej zlewki i zalać 10 ml 0.1 M NaF. Dokładnie wymieszać.

**OBSERWACJA:** Co się stało w zlewce po dodaniu NaF?

Uzyskany homogenat przesączyć przez bibułę filtracyjną umieszczoną w lejku.

Pobrać z przesączu 100 µl do czystej probówki eppendorf i podpisać (nr grupy, roślina, data, NR 1).

Pozostały na bibule osad wyrzucić. Zmierzyć (oszacować) objętość przesączu i dodać delikatnie po zlewce taką samą objętość nasyconego  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**OBSERWACJA:** Co się stało w zlewce po dodaniu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ?

Otrzymany w ten sposób roztwór przenieść do 12 probówek typu eppendorf. Wszystkie probówki włożyć do wirówki i wirować przez 5 minut z prędkością 1,500 x g.

Pobrać z nadsączu 100 µl do czystej probówki eppendorf i podpisać (nr grupy, roślina, data, NR 2).

Po usunięciu supernatantu, pozostałe w próbkach osady rozpuścić dodając po 500 µl 0,1 M buforu cytrynianowego pH 4.8, następnie zebrać do jednej probówki typu Falcon na 15 ml i dodać uzgodnioną z prowadzącym zajęcia objętość 0,1 M buforu cytrynianowego pH 4.8, maksymalnie do 10 ml. Dokładnie wymieszać, tak by wszystkie grudki osadu się rozpuściły. Wytrząsać na wytrząsarce przez około 20 sekund, co jakiś czas chłodząc próbkę w łaźni lodowej.

Ponownie przenieść roztwór do nowych probówek typu eppendorf po 2.0 ml (lub odpowiednio mniejszej liczby) i wirować przez 5 minut z prędkością 300 x g. Otrzymany supernatant jest roztworem zawierającym badany enzym!!!

Pobrać 100 µl roztworu z enzymem do czystej probówki eppendorf i podpisać (nr grupy, roślina, data, NR 3)

**OBSERWACJA:** Jakiego koloru jest otrzymany preparat, czy jest przezroczysty?

**Delikatnie zebrać supernatant do nowej próbówki na 15 ml w celu oznaczenia aktywności tyrozynazy i podpisać (imię i nazwisko, data, nazwa rośliny, z której otrzymano enzym). Próbkę przechowywać w stanie zamrożonym do czasu wykonania dalszych eksperymentów.**

#### ***B. Oznaczenie stężenia białka metodą pomiaru absorbancji w nadfiolecie***

Większość białek dzięki obecności tyrozyny i tryptofanu wykazuje maksimum absorpcji w  $\lambda=280$  nm. Związkami mogącymi wpływać na wielkość absorbancji w  $\lambda=280$  nm są kwasy nukleinowe. Maksimum absorpcji dla kwasów nukleinowych występuje przy  $\lambda=260$  nm. Ze względu na wpływ wszystkich składników roztworu otrzymanego białka poniższa metoda pozwala na oszacowanie przybliżonej zawartości białka w preparacie.

Odczynniki:

- ❖ Roztwory Nr 1, Nr 2 i Nr 3.

Wykonanie:

- ❖ ustawić urządzenie na pomiar przy długości  $\lambda = 280$  nm
- ❖ skalibrować spektrofotometr względem próbki referencyjnej
- ❖ umieścić 10  $\mu$ l badanego roztworu Nr 1 i uzupełnić 990  $\mu$ l roztworem stosowanym jako próbka referencyjna
- ❖ oznaczyć absorbancję przy  $\lambda = 280$  nm
- ❖ ustawić urządzenie na pomiar przy długości  $\lambda = 260$  nm
- ❖ skalibrować spektrofotometr względem próbki referencyjnej
- ❖ umieścić kuwetę z badanym roztworem i oznaczyć absorbancję przy  $\lambda = 260$  nm
- ❖ obliczyć stężenie białka ze wzoru (szerokość kuwety 1 cm):  
$$\text{Stężenie białka (mg/ml)} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$
- ❖ pomiary powtórzyć dla w roztworów Nr 2 i 3.

OPRACOWANIE SPRAWOZDANIA:

- Sprawozdanie proszę przygotować w parach (dwie osoby izolujące enzym z tej samej rośliny)
- Sprawozdanie proszę przygotować w edytorze tekstu wg formularza (w wyjątkowych sytuacjach napisane odręcznie) zamieszczonego na stronie:  
[www.chemia.uj.edu.pl/~kurpiews/dydaktyka.html](http://www.chemia.uj.edu.pl/~kurpiews/dydaktyka.html)
- W I części sprawozdania proszę umieścić obserwacje i krótkie odpowiedzi na poniższe pytania dotyczące wykonania ćwiczenia:
  1. W jakim celu dodajemy do rozdrobnionych roślin NaF?
  2. W jakim celu dodajemy do homogenizatu roztwór  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ? Jakich innych substancji można użyć w tym samym celu?
  3. Wyjaśnij pojęcie punkt izoelektrycznego białka i podaj wartość pI tyrozynazy.
  4. Podaj trzy metody stosowane do zniszczenia błony komórkowej w procesie izolacji białek z materiału biologicznego.
  5. Dlaczego ekstrakcję enzymu prowadzimy w możliwie najniższej temperaturze? Zaproponuj inny, niż obniżenie temperatury, sposób zminimalizowania tego niekorzystnego zjawiska.
  6. Podaj obliczone stężenia białka w roztworach Nr 1-3.
  7. Znając objętości otrzymanych preparatów i stężenie białka porównaj ilość białka w preparatach- wyjaśnij otrzymane wyniki.
  8. Mając do dyspozycji 1L buforu cytrynianowego (pH 4.8) o stężeniu 0.5 M, wykonaj obliczenia i napisz jak otrzymać 180 ml buforu cytrynianowego o stężeniu 0.25 M.
- W II części proszę krótko odpowiedzieć na pytania z Zestawu 1 (grupy A), Zestawu 2 (grupy B) i Zestawu 3 (grupy C) w oparciu o podany artykuł. Zestawy pytań i artykuł dostępne u prowadzących lub pod adresem:  
[www.chemia.uj.edu.pl/~kurpiews/dydaktyka.html](http://www.chemia.uj.edu.pl/~kurpiews/dydaktyka.html)

LITERATURA:

- „Ćwiczenia z Biochemii” red. L. Kłyszajko-Stefanowicz
- „Analiza instrumentalna w biochemii. Wybrane problemy i metody instrumentalnej biochemii analitycznej” A. Kozik, M. Rapała-Kozik, I. Guevara-Lora
- „Praktikum z biochemii dla studentów biologii i biotechnologii” red. A. Dubin i B. Turyna