

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije

Eksperimentalne metode v biokemiji

Asist. Felicita Urzi

DRUGO UČNO GRADIVO
(Zbrano gradivo za vaje iz biokemije)

34 STRANI

Dodiplomski študijski programi: Biopsihologija, Biodiverziteta in
Bioinformatika

PRVA IZDAJA

Koper, 2015

Kazalo vsebine

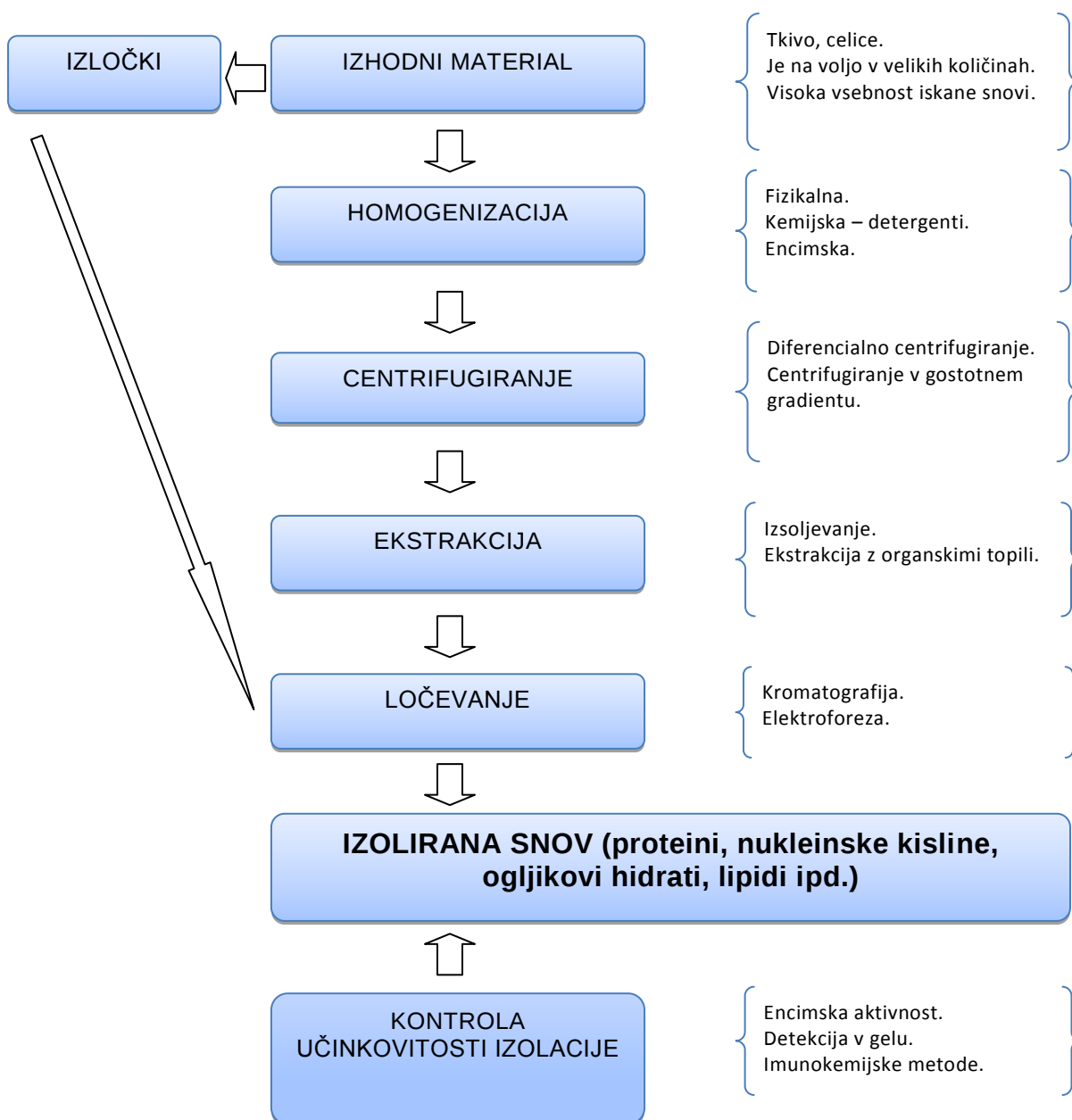
IZOLACIJA BIOLOŠKIH MOLEKUL	3
PROTEINI	4
Izhodni material.....	4
Homogenizacija	4
Izolacija	5
Ekstrakcija	7
Ločevanje	8
Kontrola izolacije	15
Encimska kinetika	18
ENCIMSKA INHIBICIJA	25
Tipi inhibicij glede na način vezave inhibitorja.....	26
Določanje kinetičnih konstant pri kompetitivni in nekompetitivni inhibiciji	27
KOLORIMETRIČNO DOLOČANJE ZUNAJCELIČNEGA DOPAMINA.....	31
Dopamin	31
LITERATURA	34

Področje biokemije je raznoliko in je del različnih področij, kot so celična biologija, molekularna biologija in medicinske vede. Biokemija proučuje strukturo, lastnosti in procese življenjsko pomembnih molekul, kot so beljakovine, nukleinske kisline, ogljikovi hidrati in maščobe. Razumevanje procesov teh pomembnih molekul, ki se v organizmih odvijajo na nivoju celic, pripomore k boljšem razumevanju življenja (Wenk & Fernandis, 2007).

IZOLACIJA BIOLOŠKIH MOLEKUL

Če želimo raziskovati procese, ki se v organizmih odvijajo na nivoju celice, je najprej treba posamezne molekule, ki pri tem sodelujejo, izolirati od vseh ostalih.

Naslednji je primer postopka izolacije snovi za potrebe biokemijskih raziskav.



Slika 1. Shema načrta izolacije snovi, kot so proteini, nukleinske kisline, ogljikovi hidrati in lipidi.

PROTEINI

Izolacija proteinov je prvi korak k razumevanju njihovih lastnosti.

Izolacija proteinov nam omogoča proučevanje njihove strukture, funkcionalnosti in interakcije z drugimi molekulami. Proteine običajno izoliramo iz izhodnega materiala z uporabo serij postopkov. Količina izoliranih proteinov je predvsem odvisna od uspešnosti postopkov izolacije in izbire izhodnega materiala.

Izhodni material

Izhodni material je lahko organizem, organ, celična kultura ali kri. Izberemo ga na podlagi podatkov o vsebnosti, razpoložljivosti in stabilnosti iskane molekule.

Po prvi stopnji, ko izberemo izhodni material, je iz njega treba izolirati celične komponente. V ta namen pripravimo izolacijski načrt, ki običajno vključuje postopke homogenizacije, centrifugiranja, ekstrakcije in ločevanja. Izolacijski načrti so razviti na podlagi poskušanj, napak in preteklih izkušenj (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002).

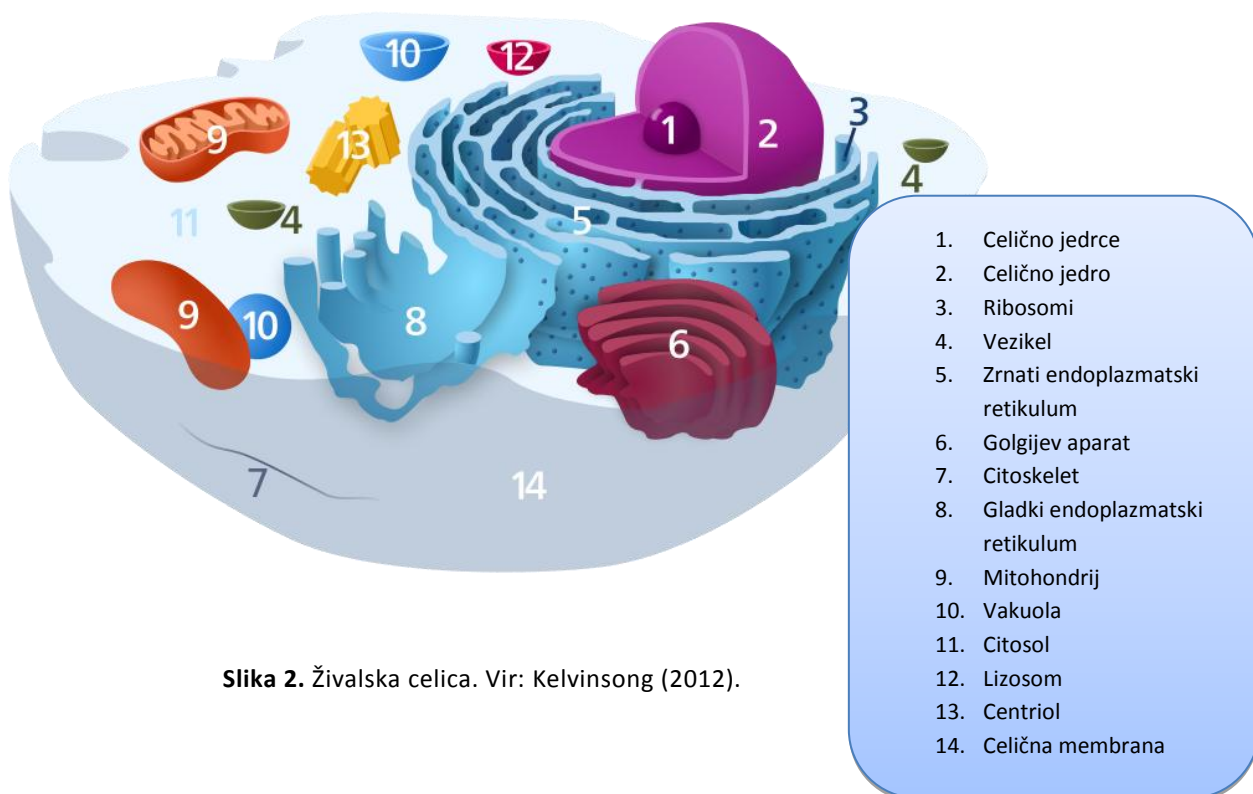
Homogenizacija

Homogenizacija je postopek, s katerim razbijemo celične membrane. To lahko dosežemo:

- s fizikalnimi (homogenizator, terilnice ...),
- kemijskimi (detergenti ...) in
- encimskimi postopki (lizocim, celulaze ...).

Proteini, ki se nahajajo v celici, se tako izločijo v medij – homogenizat.

Homogenizacija ni potrebna za proteine, ki se nahajajo v krvi, to je izvencelični tekočini (serumski in ekskrecijski proteini) (Berg idr., 2002).



Slika 2. Živalska celica. Vir: Kelvinsong (2012).

Pogoji homogenizacije morajo biti takšni, da se struktura in funkcionalnost proteinov ne spremenita. Z upoštevanjem nekaterih načel pri izbiri pogojev za izvedbo homogenizacije lahko dosežemo izolacijo velike količine zelene komponente z majhno stopnjo denaturacije. Pri tem moramo biti pozorni na več dejavnikov.

Dejavniki, ki vplivajo na homogenizacijo

1. Denaturacija proteinov (proteini lahko denaturirajo pri skrajnih vrednostih pH)

- Homogeniziramo pri fizioloških vrednostih pH.
- Uporabljamo pufre s vrednostjo pH med 5 in 7 (npr. fosfatni ali acetatni pufer).

2. Encimska razgradnja proteinov (proteaze cepijo peptidne vezi in tako razgrajujejo proteine)

- Če so v izhodnem materialu prisotne proteaze, moramo med homogenizacijo vzdrževati pogoje, ki zavirajo delovanje proteaz, to je ali nizka temperatura pod 4°C, ali sprememba pH, ali dodatek kemičnih inhibitorjev, ali dodatek EDTA.

3. Oksidacija proteinov z zračnim kisikom ali oksidanti

- Homogeniziramo v prisotnosti reducenta (npr. cistein, ditioneitol, 2-merkaptotanol).
- Preprečujemo penjenje raztopine in s tem vnos kisika v raztopino (pazljivo mešanje).

5. Proteini lahko denaturirajo zaradi prisotnosti alkaloidov in polifenolov, ki se sproščajo pri izolaciji snovi iz rastlinskih materialov

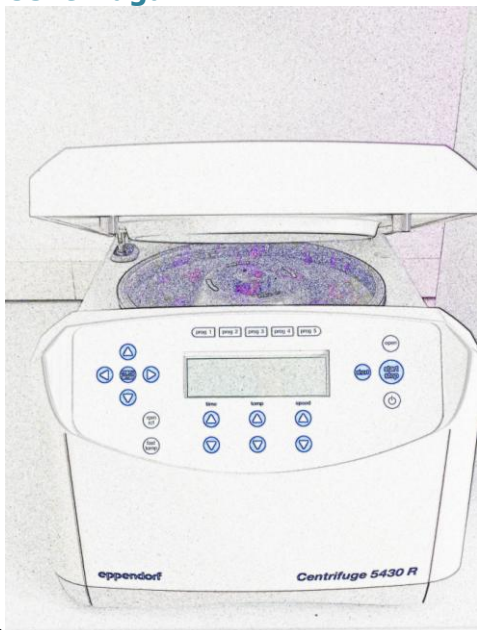
- Homogeniziramo ob prisotnosti polivinilpirolidona.

Vir: Burgess & Deutscher (2009).

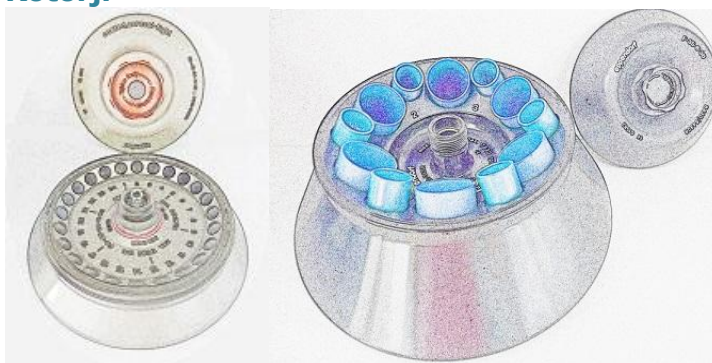
Centrifugiranje

Ko s postopkom homogenizacije razbijemo celično membrano in se celični organeli sprostijo v raztopino, ostane večina celičnih organelov nedotaknjenih. Sproščene organele nato ločimo s centrifugiranjem pri različnih kotnih hitrostih. Zaradi njihove različne velikosti se organeli razlikujejo tudi v stopnji sedimentacije. Goste in težje molekule se že pri nizkih hitrostih usedejo na dno centrifugirke, lažje pa ostanejo v supernatantu. Supernatant ponovno centrifugiramo pri večjih hitrostih in tako ločimo še druge organele. Postopek lahko ponavljamo (tako dobljene frakcije imajo v vsaki stopnji nižjo gostoto in nižje število različnih organelov), dokler v supernatantu ne ostanejo topni proteini. Postopno centrifugiranje, kjer v posameznih stopnjah ločimo različne organele, imenujemo diferencialno centrifugiranje. Posamezni frakciji lahko določimo stopnjo čistosti. Običajno ena frakcija služi kot material za nadaljnje tehnike izoliranja proteinov (Berg idr., 2002).

Centrifuga



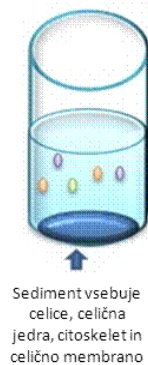
Rotorji



Slika 3. Centrifuga Eppendorf z različnimi rotorji.

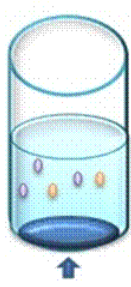
Shema diferencialnega centrifugiranja

Centrifugiranje
1.000 g, 10 min



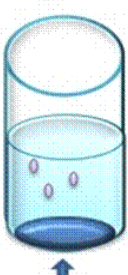
Sediment vsebuje
celice, celična
jedra, citoskelet in
celično membrano

Centrifugiranje
20.000 g, 20 min



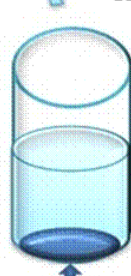
Sediment vsebuje
mitohondrije, lizosome
in peroksisome

Centrifugiranje
80.000 g, 60 min



Sediment vsebuje
mikrosome in
majhne vezikle

Centrifugiranje
150.000 g, 3 ure



Sediment vsebuje
ribosome in večje
makromolekule

Supernatant vsebuje
topne proteine

Centrifugiranje je ena najbolj razširjenih metod ločevanja delcev.

S tem postopkom ločimo celični homogenizat v frakcije.

Po centrifugiranju dobimo na dnu centrifugirke usedlino ali sediment in nad njim tekočino, ki jo imenujemo supernatant.

Slika 4. Diferencialno centrifugiranje.

Ekstrakcija

Nadaljnja tehnika čiščenja, po postopku centrifugiranja, kjer imamo supernatant z velikim številom topnih proteinov, je postopek ekstrakcije s pomočjo izsoljevanja.

Veliko proteinov, ki se nahajajo v citosolu, je vodotopnih. Njihova topnost je odvisna od ionske moči in pH raztopine. S spreminjanjem pogojev (dodajanje soli ali organskih topil) spremenimo ionsko moč in s tem topnost proteinov v raztopini.

Pri ekstrakciji izkoriščamo različne lastnosti proteinov, ki vplivajo na njihovo topnost oz. netopnost, in jih tako selektivno izločimo iz raztopine v obliki netopne oborine.

Postopek ekstrakcije, v katerem spreminjamo ionsko moč raztopine z dodajanjem soli, imenujemo izsoljevanje. Če vodni raztopini, v kateri so proteini v veliki meri hidratizirani, dodamo sol, bo ta zaradi večjega naboja, bolj privlačila molekule vode kot proteini. To tekmovanje za hidratizacijo, ki je običajno bolj naklonjeno soli, vodi do interakcij med proteini, ki se začnejo združevati in se na koncu izločijo kot netopna oborina. Z izbiro koncentracije soli lahko vplivamo na izsoljevanje želenega proteina. Zaradi dobre topnosti tudi pri nižjih temperaturah je najpogosteje uporabljena sol amonijev sulfat (Wenk & Fernandis, 2007).

Topnost proteinov

1. Učinki koncentracije soli v raztopini – ionska moč

- **Vsoljevanje (angl. *salting in*)** – povečanje topnosti proteinov v raztopinah z nizko koncentracijo soli. V splošnem velja, da pri nizkih ionskih močeh topnost proteina narašča.
- **Izsoljevanje (angl. *salting out*)** – zmanjšanje topnosti proteinov v raztopinah z visoko koncentracijo soli. Pri višjih ionskih močeh topnost proteinov običajno pada.

2. Učinki organskih topil

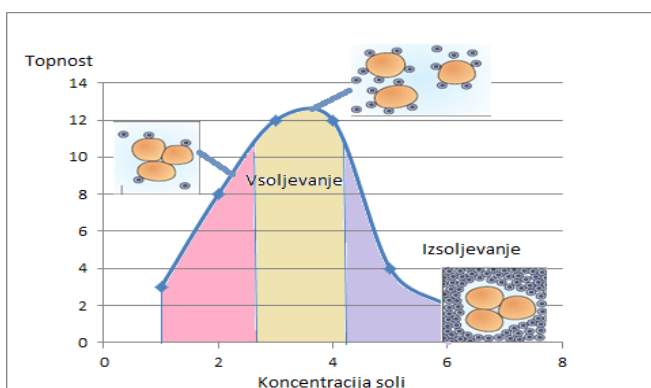
- Nekateri proteini lahko selektivno oborimo s povečevanjem koncentracije organskih topil v vodnih raztopinah.

3. Učinki pH

- Proteini imajo izoelektrično točko (pI), to je vrednost pH, pri kateri imajo nevtralen naboj in so najmanj topni. Različni proteini imajo različne izoelektrične točke, tako da je mogoče vplivati na relativno topnost proteinov v raztopini s spremembo pH.

Vir: Nelson, Lehninger, & Cox (2008).

Topnost proteinov pri različni koncentraciji soli



Slika 5. Topnost proteinov.

Efekta vsoljevanje in izsoljevanje sta različna za različne proteine. Razlike v izsoljevanju med proteini izkoriščamo za njihovo ločevanje. Najprej koncentracijo soli dvignemo tik pod točko, kjer protein, ki se prečiščuje, postane netopen (s centrifugiranjem odstranimo ostale oborjene proteine). Nato dvignemo koncentracijo soli, do točke, kjer iskani protein ni več topen in ga v obliki oborine izločimo s centrifugiranjem.

Ločevanje

Ekstrakciji sledijo različni postopki ločevanja (čiščenja) proteinov. Postopki, s katerimi ločimo proteine v razne frakcije, običajno temeljijo na lastnostih, kot so velikost, naboj, polarnost in specifičnost vezave.

Izbira postopka glede na naboj, polarnost, velikost in specifičnost vezave

1. Naboj:

- ionskoizmenjevalna kromatografija,
- elektroforeza,
- izoelektrično fokusiranje.

2. Polarnost:

- adsorpcijska kromatografija,
- ionskoizmenjevalna kromatografija,
- papirna kromatografija.

3. Velikost:

- dializa in ultrafiltracija,
- gelska elektroforeza,
- gelska filtracija,
- ultracentrifugacija,
- masna spektrometrija.

4. Specifičnost vezave:

- afinitetna kromatografija.

Vir: Smith (2002).

Gelska filtracija (kromatografija)

Za gelsko filtracijo uporabljamo steklene kolone, napolnjene s stacionarno (trdno) fazo. Trdno fazo sestavljajo porozne kroglice gela (dekstran, poliakrilamid, polistiren, agaroza) z enakomerno velikostjo por. Volumen oz. prostor med kroglicami gela (prazen volumen kolone) zapolnjuje mobilna (tekoča) faza, ki je največkrat raztopina NaCl ali določenega pufra.

Vzorec nanašamo na vrh kolone in ga s pomočjo mobilne faze eluiramo (izpiramo) skozi gel.

Vzorec običajno vsebuje različno velike molekule, ki potujejo skozi kolono s pomočjo mobilne faze. Velike molekule ne morejo vstopati v pore gela in potujejo mimo kroglic po najkrajši (najhitrejši) poti skozi kolono. Manjše molekule vstopajo v pore gela in zato potujejo skozi kolono počasneje.

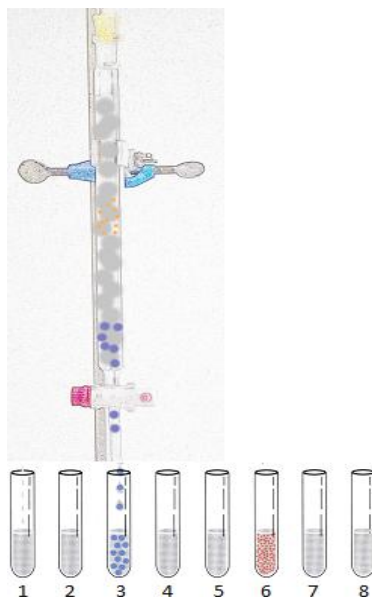
Lastnost gelske filtracije, da večje molekule hitreje potujejo skozi kolono v primerjavi z manjšimi, uporabimo za ločevanje molekul glede na njihovo velikost.

S stopnjo zamreženosti stacionarne faze (gela) in dimenzijami kolone lahko spreminjamo razpon velikosti por in dolžino poti molekul ter tako vplivamo na uspešnost ločevanja molekul različnih molekulskih mas. Na splošno daljše in ožje kolone omogočajo boljšo ločljivost (Switzer & Garritty, 1999).

Gelsko filtracijo lahko uporabljamo tudi za razsoljevanje vzorcev proteinov ali drugih polimernih molekul. Če želimo iz raztopine proteinov odstraniti soli, ki smo jih pred tem uporabili v postopku izolacije, lahko uporabimo kolono za gelsko filtracijo z ustrezno velikostjo por. Pore kroglic gela

morajo biti dovolj majhne, da se v njih protein ne zaustavlja, in dovolj velike, da ioni, ki jih želimo ločiti, lahko v celoti vstopajo v pore gela. Kot mobilno fazo uporabimo raztopino pufra (*ion exchange chromatography*, 2004).

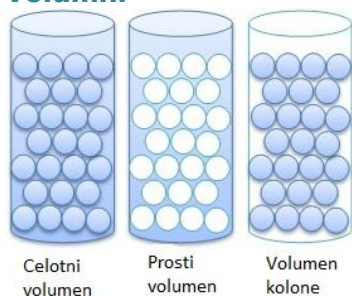
Gelska filtracija:



Slika 6. Kolona za gelsko filtracijo.

Na osnovi merjenja hitrosti potovanja molekule skozi kolono (elucijskega volumna), lahko določimo njeno molekulsko maso (M_r). Za določanje velikosti molekule pri gelski filtraciji moramo poznati volumen, ki ga zavzemajo kroglice gela V_x in prosti volumen V_0 (volumen med kroglicami), celotni volumen kolone (V_t) in elucijski volumen (V_{el}) vzorca. To pomeni, da moramo poznati razmerje med velikostjo proteinov in njihovim obnašanjem v posamezni koloni za gelsko filtracijo (*Gel filtration*, 2002).

Volumni



Celotni volumen kolone: $V_t = V_x + V_0$

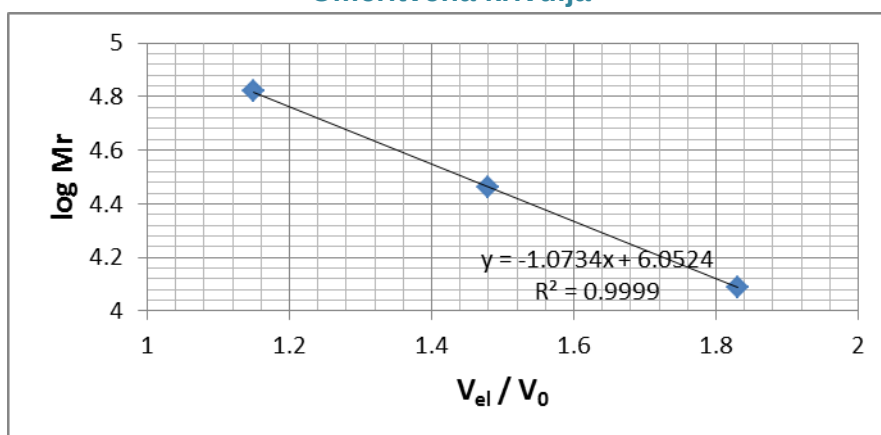
Slika 7. Celotni, prosti in volumen gelske kolone.

Elucijski volumen (V_{el}) je volumen raztopine, ki ga moramo po nanosu vzorca naliti na kolono, da se vzorec spere z vrha kolone do njenega izhoda. Elucijski volumen molekul, ki so tako velike, da ne morejo zaiti v nobeno poro, na razpolago jim je torej le prostor med kroglicami, je enak prostemu volumnu kolone (V_0). Sklepamo lahko, da bo v primeru, ko na kolono nanesemo zmes

molekul, ki so sicer različno velike, vendar vse večje od por gela, njihov elucijski volumen enak. Eluirale se bodo torej hkrati, V_{el} pa bo enak prostemu volumnu kolone. Volumen, ki je na razpolago manjšim delcem, je večji od V_0 , vendar ne more presegati V_t .

Za določanje lastnosti kolone moramo posamezno kolono umeriti s serijo proteinov z znanimi molekulskimi masami. Za določitev prostega volumna uporabimo protein z zelo veliko molekulsko maso, ki skozi kolono potuje z mobilno fazo, brez zahajanja v pore gela. Na podlagi izmerjenih elucijskih volumnov standardnih raztopin proteinov izrišemo umeritveno krivuljo. Nato na kolono nanesemo vzorec in določimo elucijski volumen iskane molekule. Izračunamo vrednost ulomka V_{el}/V_0 za iskano molekulo in nato lahko iz umeritvene krivulje izračunamo molekulsko maso (Biosciences, 2002).

Umeritvena krivulja

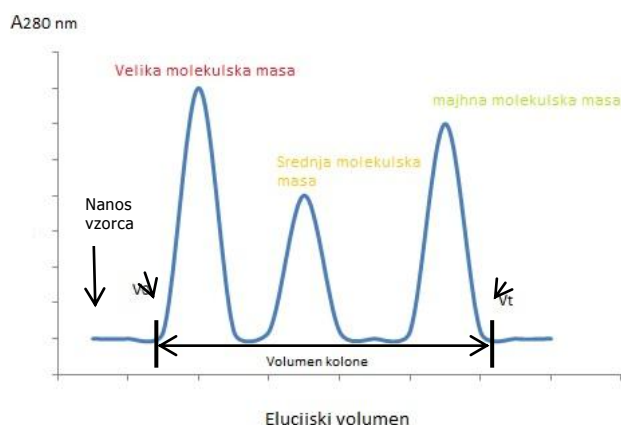


Slika 8. Umeritvena krivulja za gelsko filtracijo. Uporabljeni standardi proteinov: goveji serumski albumin (66 kDa); goveji eritrociti (29 kDa); citokrom C (12,4 kDa); modri dekstran (200 kDa).

Resolucija gelske filtracije je odvisna od selektivnosti filtracijskega medija in izbranih parametrov, ki vplivajo na selektivnost. Po izbiri filtracijskega medija z ustrezno selektivnostjo postaneta volumen vzorca in dimenzija kolone kritična parametra, ki vplivata na dobro ločljivost molekul pri gelski filtraciji. Volumen vzorca, ki ga nanesemo na kolono, naj ne bi presegel 5 % celotnega volumna kolone. Večji volumni vodijo do slabše ločljivosti molekul in prekrivanja vrhov v elucijskem diagramu (*Gel filtration*, 2002).

Količino eluiranih proteinov ovrednotimo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm. Iz podatkov o elucijskem volumnu in izmerjeni absorbanci lahko narišemo elucijski diagram, ki kaže na resolucijo ločevanja. Ozki in jasni vrhovi pomenijo dobro ločitev molekul.

Elucijski diagram (kromatogram)



Slika 9. Kromatogram.

Ionskoizmenjevalna kromatografija

Ta vrsta kromatografije temelji na elektrostatičnih interakcijah med nasprotno nabitimi delci. Glede na površinske ostanke na proteinih in pH vrednosti pufra ima protein lahko neto pozitiven ali negativen naboj. Idealen pufer je v območju fiziološkega pH, med 6 in 8, kjer ima tudi večina proteinov negativen naboj in so najbolj stabilni. Stacionarno fazo v koloni predstavljajo nabite skupine, ki so vezane na kroglice gela (agaroza, dekstran, celuloza idr.). Na pozitivne skupine se bodo absorbirale molekule z negativnim neto nabojem (anioni).

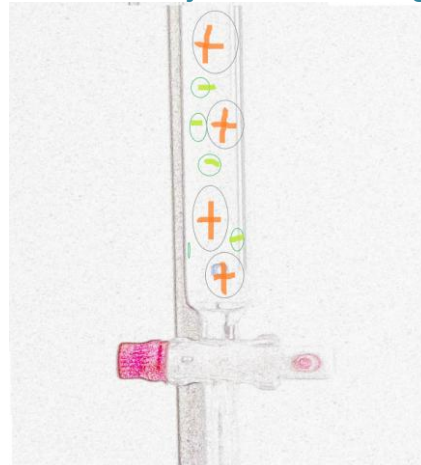
Tak gel imenujemo anionski izmenjevalec.

Kationski izmenjevalec ima vezane negativno nabite skupine, na katere se vežejo pozitivne molekule. Glede na moč vezave pa delimo ionske izmenjevalce na močne in šibke.

Razlikujejo se v vrednosti pKa. Močni izmenjevalci so ionizirani, torej v nativni obliki, pri skoraj vseh vrednostih pH, šibki pa lahko delujejo le v ozkem območju pH.

Če smo pogoje ionske izmenjave (vrsta izmenjevalca in pH začetnega pufra) določili tako, da so se neželene komponente vzorca vezale na gel, je ločitev končana, če pa so se proteini, ki jih želimo izolirati, vezali na ionski izmenjevalec, jih moramo iz kolone še izpirati (eluirati) (*Gel filtration*, 2002).

Ionskoizmenjevalna kromatografija



Slika 10. Ionsko izmenjevalna kromatografija.

Afinitetna kromatografija

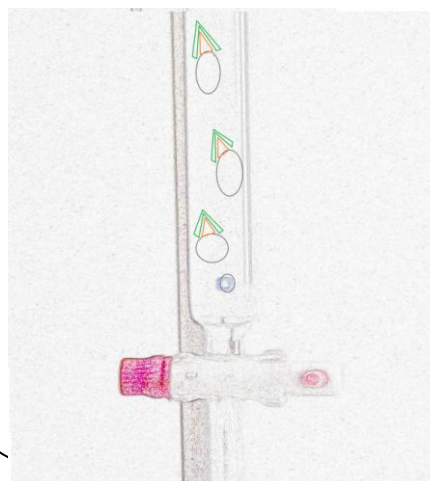
Afinitetna kromatografija je metoda ločevanja, ki temelji na specifičnih bioloških interakcijah. Ločevanje poteka na osnovi reverzibilnih interakcij med proteini in ligandom, vezanim na inertni nosilec. Vezava ligand-tarčna molekula je zelo specifična (npr. encim-substrat, encim-inhibitor; receptor-vitamin, receptor-hormon; protitelo-antigen; nukleinska kislina-komplementarna nukleinska kislina).

Metoda poteka v več stopnjah:

- imobilizacija liganda,
- nanos vzorca,
- elucija vezanih molekul.

Ligand kovalentno vežemo na gel preko aaminskih, hidroksilnih ali sulfhidrilnih skupin. Na vezani ligand se po nanosu vzorca reverzibilno vežejo specifične (oz. zelene) molekule. Vezava med ligandom in molekulo mora biti zelo reverzibilna, da lahko molekulo odstranimo od liganda in je s tem ne spremenimo (ostane biološko aktivna). Pred elucijo, kolono nekaj časa izpiramo z začetnim pufrom, da odstranimo vse nevezane snovi, ki so se zadržale v gelu zaradi kapilarnosti.

Afinitetna kromatografija



Slika 11. Afinitetna kromatografija.

Molekule, ki so se vezale na ligand, lahko iz kolone izperemo na več načinov. Vezi, s katerimi sta ligand in molekula, ki jo izoliramo, povezana v kompleks, so lahko elektrostatične, hidrofobne ali vodikove. Prekinemo jih lahko s specifičnim kompetitivnim ligandom ali nespecifično s spremembo pH, ionske moči, dielektrične konstante ali temperature (Hage & Cazes, 2005).

Gelska elektroforeza

Elektroforeza je pomembna tehnika za ločevanje proteinov in drugih makromolekul, kot sta DNA in RNA. Na splošno se ne uporablja za čiščenje proteinov v velikih količinah, ker imamo za to na voljo enostavnejše metode, pa tudi ker elektroforezne metode pogosto neugodno vplivajo na strukturo in s tem funkcijo proteinov. Metoda je uporabna predvsem pri postopkih čiščenja proteinov, saj nam omogoča hitro oceno sestave vzorca. Z ločitvijo dobimo podatke o številu in količini različnih proteinov v vzorcu ali stopnjo čistosti posameznega preparata proteinov.

Elektroforeza temelji na fizikalni zakonitosti, da nabiti delci potujejo v električnem polju. Večina bioloških molekul se v raztopini obnaša kot anion ali kation in zato pod vplivom električnega polja lahko potujejo skozi trdni nosilec ali gel, proti katodi ali anodi (Smith, 2002).

Gel deluje kot molekulsko sito in tako upočasnjuje prehod proteinov približno v sorazmerju z njihovim razmerjem naboja in mase. Na migracijo lahko vpliva tudi oblika beljakovin.

Pri elektroforezi je električni potencial (E), sila, ki deluje na molekule in vpliva na njihovo gibanje. Elektroforezna mobilnost molekule (μ) je podana kot razmerje med hitrostjo potovanja molekule (v) in električnim potencialom (E). Elektroforezna mobilnost je tudi enaka razmerju med nabojem molekule (Z) in zavornim koeficientom (f), kar deloma odraža obliko določene beljakovine.

Elektroforezna mobilnost

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Z}{f}$$

Hitrost potovanja molekul

$$v = \frac{E \cdot Z}{f}$$

Na delec z nabojem Z deluje sila $E \cdot Z$, zaradi katere se delec giblje proti elektrodi. V nasprotno smer gibanja delca deluje nanj zavorna sila f , ki zmanjša hitrost njegovega potovanja. Zavorna sila, ki bo delovala na delec je odvisna od velikosti in oblike delca.

Iz enačbe za mobilnost je razvidno, da se bodo pri potovanju skozi električno polje ločile tudi enako nabite molekule, če se bodo razlikovale po velikosti in obliki, saj nanje deluje različna zavorna sila (Nelson idr., 2008). Tudi z uporabo različnih nosilcev z različno velikostjo por lahko vplivamo na zavorno silo in ločitev molekul. Najpogosteje uporabljeni gelski nosilci so agarozni in poliakrilamidni.

Dimenzije por v agaroznih gelih so v splošnem precej večje kot tiste v poliakrilamidnih, zato se agaroz uporablja predvsem za ločevanje zelo velikih molekul (npr. nukleinske kisline), poliakrilamidni gel pa običajno uporabljamo za ločevanje proteinov. Zamreženost gelov uravnavamo s koncentracijo agaroze oz. akrilamida in bisakrilamida (*Protein electrophoresis*, 1999).

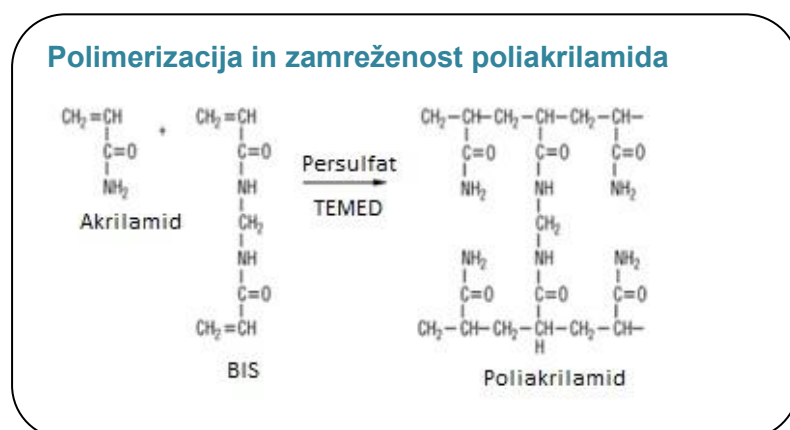
Agarozna elektroforeza poteka horizontalno na gelu, ki je v celoti potopljen v elektrolit (v banjici), poliakrilamidna pa vertikalno, tako da je gel polimeriziran med dvema steklenima ploščama, elektrolit pa je nanesen na zgornji in spodnji strani gela.

Proteine pogosto ločimo z uporabo elektroforeze na poliakrilamidnem gelu (angl. Polyacrylamide gel electrophoresis-PAGE). Metodo uporabimo za identifikacijo posameznega proteina v kompleksnih vzorcih ali za ločitev več proteinov v enem vzorcu.

Obstaja več oblik PAGE, s katerimi dobimo različne informacije o proteinih. Nativna PAGE, v kateri proteini ostanejo v nativni obliki (ne denaturirajo), loči proteine glede na razmerje masa – naboj. Natrijev dodecil sulfat poliakrilamidna gelska elektroforeza (angl. SDS-PAGE), pri kateri denaturiramo proteine z anionskim detergentom (natrijev dodecil sulfat – SDS) je ena najbolj uporabljenih elektroforeznih metod, katera loči proteine predvsem glede na njihovo maso. Dvodimenzionalna PAGE loči proteine glede na izoelektrično točko v prvi dimenziji in glede na maso v drugi smeri (Smith, 2002).

Poliakrilamidni geli (PAGE)

Akrlamid je material za pripravo elektroforeznih gelov za ločevanje proteinov po velikosti. Z dodatkom polimerizacijskega agensa (amonijev persulfat) k mešanici akrilamida in bisakrilamida ustvarimo zamreženost polimera. N,N,N,N'-tetrametilenediamin (TEMED) katalizira polimerizacijsko reakcijo s spodbujanjem nastajanja prostih radikalov iz amonijevega persulfata (Janson, 2011).



Razmerje bisakrilamida (BIS) in akrilamida kot tudi skupna koncentracija obeh komponent vplivata na velikost por in togost končne zamreženosti gela. To vpliva na možnost ločevanja proteinov glede na njihovo molekulsko maso.

Slika 12. Polimerizacija in zamreženost poliakrilamida.

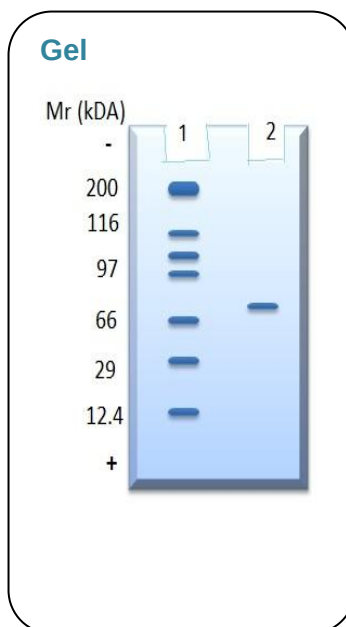
Velikost por, ustvarjenih v gelu, je obratno sorazmerna s količino uporabljenega akrilamida. 7-odstotni poliakrilamidni gel ima večje pore kot 12-odstotni. Geli z nizkim odstotkom akrilamida se navadno uporabljajo za ločevanje velikih proteinov, geli visokim odstotkom pa za ločevanje manjših proteinov.

Elektroforezni geli so potopljeni v pufre, ki zagotavljajo prevajanje električnega toka skozi matrico (elektroliti). Vrednost pH elektrolita je običajno med 8 in 9, pri tem pH je večina proteinov negativno nabitih, zato potujejo proti pozitivno nabiti elektrodi (Janson, 2011).

Vzorec nanese v žepke na vrhu gela. Ker je večina vzorcev brezbarvnih, jim pred nanosom dodamo barvilo brofenolmodro, ki nam služi tudi kot indikator za elektroforezno fronto.

Barvilo potuje proti elektrodi hitreje kot proteini, zato lahko prekinemo elektroforezo, ko zapusti gel. Molekule v vzorcu, ki ga nanese v žepke, nimajo enakega začetnega položaja, tiste, ki so na dnu, bodo prve vstopile v gel, tiste na vrhu (žepke je visok nekaj milimetrov) bodo za prvimi

zaostajale ves čas potovanja skozi gel. Posledica so razširjeni pasovi (slabša ločitev). Zato za doseganje optimalne ločitve proteinov uporabimo dva različno zamrežena gela (enega nad drugim). Zgornji koncentracijski gel je maj zamrežen kot spodnji separacijski gel, zato ne ovira molekul pri potovanju. Tako se proteini skoncentrirajo in skupaj vstopijo v separacijski gel.



Slika 13. PAGE z ločenimi markerji (linija 1) ter ločenimi proteini (linija 2).

Poleg uporabe dveh gelov je treba v takem sistemu uporabiti dva različna pufra. Vrednost pH koncentracijskega pufra je običajno za dve enoti nižja od vrednosti pH separacijskega pufra. Za detekcijo proteinov po elektroforezi lahko uporabljamo različne načine, s katerimi lahko detektiramo vse proteine hkrati ali pa le določene. Nespecifično lahko proteine obarvamo z barvili (Coomassiejevim briljantno modrim, s srebrovim nitratom, amidočrnim idr.). Ta barvila se vežejo na pozitivno nabite skupine lizina, arginina ali histidina, zato se bazični proteini obarvajo močneje kakor kisli.

Če želimo detektirati točno določen protein, lahko v primeru, da gre za encim, izkoriščamo specifičnost kompleksa encim-substrat. Na gel nanese tanko plast agaroznega gela, ki vsebuje substrat. Na mestih, kjer je prisoten encim, se tvori produkt, ki je lahko obarvan. Metode ne moremo uporabiti pri SDS PAGE zaradi denaturacije proteinov (Smith, 2002).

Kontrola učinkovitosti izolacije

Cilj izolacije je pridobiti čim večjo količino želenega proteina. Proteine očistimo v več korakih z uporabo postopkov frakcioniranja. Število korakov je odvisno od zelene stopnje čistosti. Upoštevati je treba, da je končna količina izoliranega proteina nekoliko manjša od količine v izhodnem materialu, saj v posameznih korakih, kjer odstranjujemo ostale proteine, lahko izgubimo tudi del izoliranega proteina. Ob posameznih korakih zato kontroliramo učinkovitost izolacije. Kontrole so lahko kvantitativne ali kvalitativne, npr. določanje količine proteina, določanje encimske aktivnosti.

Kontrola učinkovitosti izolacije proteinov

1. Kvantitativno določanje proteinov:

- spektrofotometrično določanje koncentracije z merjenjem absorbance,
- kolorimetrične metode.

2. Encimska aktivnost:

- določanje koncentracije encima,
- določanje encimske aktivnosti.

3. Detekcija proteinov na gelu.

4. Imunološka detekcija.

Vir: Burgess & Deutscher (2009).

Kvantitativno določanje koncentracije proteinov

Za določanje koncentracije proteinov lahko uporabimo neposredno spektrofotometrično in posredne kolorimetrične metode.

Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov

Večina raztopin proteinov ima zaradi vsebnosti aromatskih aminokislin (tirozin, triptofan in fenilalanin) absorpcijski maksimum v UV-področju pri 280 nm. To lastnost izkoriščamo za merjenje absorbance pri tej valovni dolžini.

Metoda je absolutna, kar pomeni, da ne potrebujemo umeritvene krivulje. Koncentracijo proteina izračunamo iz absorbance z uporabo Beer-Lambertovega zakona:

Beer-Lambertov zakon

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A = absorbanca, ε = molarni absorpcijski koeficient ($\text{l/mol} \cdot \text{cm}$), l = dolžina optične poti (cm),
 c = molarna koncentracija (mol/l)

Beer-Lambertovo enačbo uporabimo, kadar poznamo molarni absorpcijski koeficient (ε) proteina. Molarni absorpcijski koeficient lahko natanko določimo na podlagi spektrofotometričnih lastnosti proteina, ki so odvisne od njegove strukture. Ostale metode nam omogočajo le ocenjene vrednosti.

Če poznamo število aromatskih aminokislin v proteinu, lahko zanj ocenimo molarni absorpcijski koeficient (ϵ) pri 280 nm na osnovi njegove strukture in ga empirično izračunamo s pomočjo formule. Formula za izračun: $\epsilon = n1W \cdot 5500 + n2Y \cdot 1490 + n3C-C \cdot 125$, kjer je $n1W$ število triptofanov, $n2Y$ število tirozinov in $n3C-C$ število cistinov na molekulo proteina.

Če nimamo na razpolago podatka o molarinem absorpcijskem koeficientu, kot v primeru mešanice različnih proteinov v raztopini, privzamemo grobo oceno vrednosti molarne absorpcijskega koeficienta (ϵ) pri 280 nm enako 1, oziroma vrednost absorbance pri 280 nm (A_{280}) = 1, za mešanico proteinov, ustreza koncentraciji proteinov 1 mg/ml (Smith, 2002).

Prednosti metode spektrofotometričnega določanja koncentracije proteinov z merjenjem absorbance (A_{280}) so:

- enostavno in hitro merjenje,
- rutinsko določanje koncentracije proteinov,
- nedestruktivnost (vzorec je po meritvi nespremenjen),
- uporabnost, kadar želimo sproti določati koncentracijo proteinov, npr. med elucijo proteinov pri gelski filtraciji ali visokotlačni tekočinski kromatografiji (HPLC).

Slabost metode spektrofotometričnega določanja koncentracije proteinov z merjenjem absorbance (A_{280}) je predvsem ta, da so v bioloških vzorcih poleg proteinov pogosto prisotne tudi nukleinske kisline, ki absorbirajo svetlobo pri 280 nm, čeprav je njihov absorpcijski maksimum pri 260 nm. Warburg in Christian in kasneje Layne so vpeljali splošno zvezo za izračun približne masne koncentracije proteinov v prisotnosti nukleinskih kislin: $\gamma = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$ (mg/ml) (Smith, 2002).

Kolorimetrično določanje koncentracije proteinov

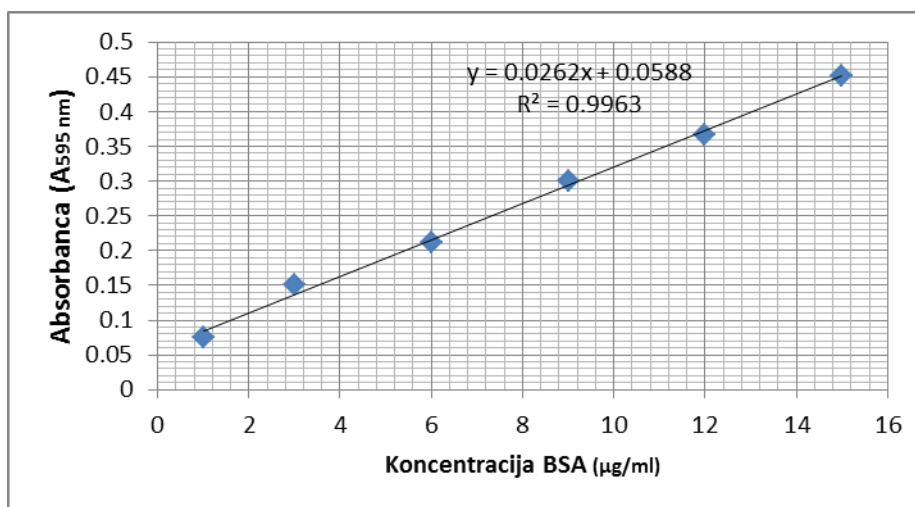
Bradfordova metoda

Barvilo Coomassie briljantno modro G-250 (barvilo v Bradfordovem reagentu) se v kislem mediju veže na protein in nastane modro obarvan kompleks. Interakcije med anionom barvila in proteina so elektrostatske (veže se predvsem na arginin ter v manjši meri na lizin in histidin) in hidrofobne (s tirozinom, triptofanom in fenilalaninom). Kompleks barvila in proteina ima absorpcijski maksimum pri 595 nm, samo barvilo pa pri 465 nm. Količina proteinov je tako lahko ocenjena z določanjem koncentracije modro obarvanega kompleksa. Koncentracijo določimo z merjenjem absorbance raztopine pri valovni dolžini 595 nm. Metoda je relativna, kar pomeni, da potrebujemo umeritveno krivuljo.

Za umeritveno krivuljo pripravimo serijo standardnih raztopin proteina znane koncentracije, jim dodamo Bradfordov reagent in raztopinam izmerimo absorbanco pri 595 nm. Iz podatkov o znanih koncentracijah standardne raztopine proteina in vrednosti izmerjene absorbance narišemo umeritveno krivuljo. Neznano koncentracijo proteinov v biološkem vzorcu lahko nato ocenimo z enačbo umeritvene krivulje.

Možni sta dve različni izvedbi testa. Standardna oblika testa je primerna za merjenje koncentracije v območju od 10 μ g do 100 μ g proteinov. Mikrotest pa nam omogoča detekcijo proteinov v območju od 1 μ g do 10 μ g (Smith, 2002).

Umeritvena krivulja – Bradford



Slika 14. Primer umeritvene krivulje za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu.

Prednosti Bradfordove metode določanja koncentracije proteinov so:

- hitra, enostavna metoda za oceno koncentracije proteinov,
- omogoča natančno določanje koncentracije proteinov,
- manj motenj zaradi prisotnosti reagentov ali neproteinskih komponent v bioloških vzorcih.

Slabost Bradfordove metode določanja koncentracije proteinov je njena destruktivnost (vzorec je po meritvi neuporaben).

Biuretska metoda

Vzorcu dodamo alkalno raztopino bakrovega sulfata in kalij-natrijevega tartata. Slednji tvori z bakrovimi ioni koordinacijsko spojino in s tem prepreči njihovo oboritev v alkalnem mediju. Peptidna vez izpodrine tartatne ligande. Bakrovi ioni tvorijo koordinacijsko spojino s štirimi NH-skupinami peptidnih vezi. Nastali kompleks ima absorpcijski maksimum pri 540–560 nm. Ker metoda temelji na peptidni vezi, je primerna za vse proteine in je zelo ponovljiva, vendar žal slabo občutljiva (potrebne so koncentracije vsaj 1 mg/ml). Proste aminokisline ne motijo (Smith, 2002).

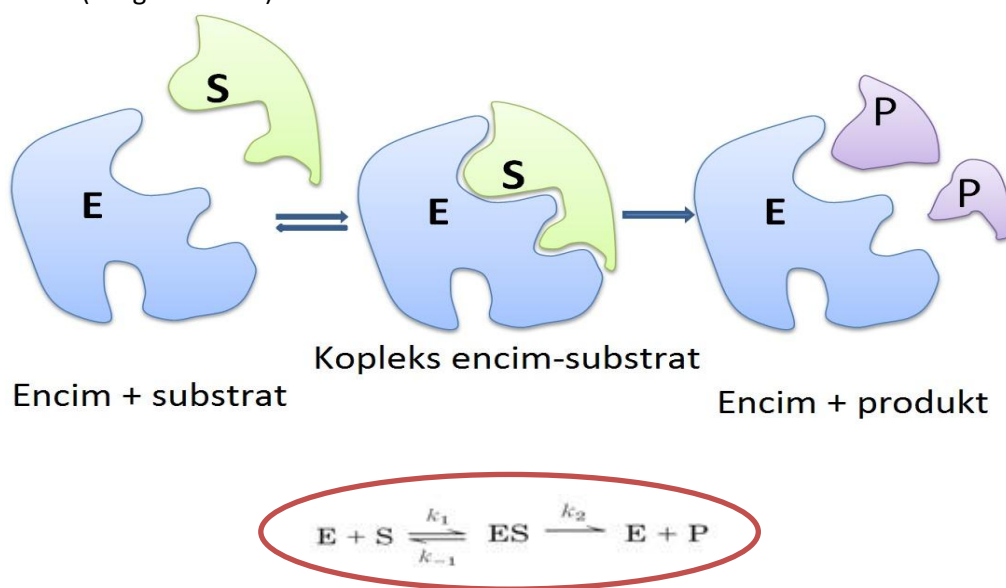
Lowryjeva (Folin-Ciocalteaujeva) metoda

Gre za zelo občutljivo metodo, ki temelji na biuretski reakciji. Po tvorbi kompleksa med ioni Cu^{2+} in peptidnimi vezmi dodamo vzorcu Folin-Ciocalteaujev reagent, ki vsebuje zmes volframatov, molibdatov in fosfatov. Zaradi redukcije tega reagenta pride do nastanka t. i. molibdenskega modrila, ki absorbira svetlobo pri valovni dolžini 750 nm. Donorji elektronov so koordinacijske vezi med bakrovimi ioni in peptidno vezjo v bližini tirozina. S to metodo lahko določamo razmeroma nizke koncentracije proteinov (do 10 µg/ml, vendar reakcijo moti precej snovi, kot npr. razni detergenti, saharoza, glicerol idr.). Za ponovljivost rezultatov je zelo pomembno upoštevanje časa, ker se v alkalnem mediju, barvilo molibdensko modro počasi razkaja. Pomembna je vrednost pH, ki mora biti med 10,0 in 10,5. Metoda ni uporabna za proteine, ki v svoji strukturi nimajo tirozina (Smith, 2002).

Encimska kinetika

Encimi so kompleksni proteini, ki v živih organizmih delujejo kot katalizatorji kemičnih reakcij. Nastajajo v celicah, delujejo neodvisno od njih in sodelujejo pri skoraj vseh biokemičnih procesih v telesu. Značilnost encimov je, da se pri teh procesih sami ne spremenijo. Kot vsi katalizatorji tudi encimi vzpodbujajo kemične reakcije pri nižji aktivacijski energiji. Zato se te reakcije pod vplivom encimov odvijajo tudi večmilijonkrat hitreje.

Encimska kinetika nam podaja informacije o hitrosti encimskih reakcij, to je hitrosti, s katero iz substratov (S) nastajajo produkti (P). Skupaj z drugimi metodami nam omogoča vpogled v mehanizem delovanja nekega encima, njegove vloge v celicah ter odzivom na spremembe znotraj in zunaj celice (Berg idr. 2002).



Slika 15. Encimska reakcija.

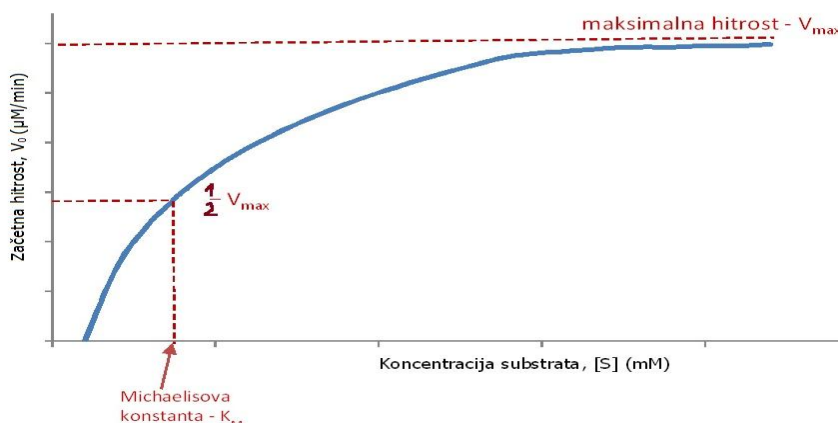
Pri encimsko katalizirani reakciji se molekula substrata pretvori v molekulo produkta. Substrat (S) se mora najprej vezati na encim (E) in tako nastane kompleks encim-substrat (ES), nato poteče reakcija in substrat se pretvori v produkt (P). Kompleks encim-produkt razpade na nespremenjeno molekulo encima in molekulo produkta (Berg idr. 2002).

Hitrost encimske reakcije kot funkcija koncentracije in specifičnosti substrata

Hitrost encimske reakcije narašča z naraščanjem koncentracije substrata, pri konstantni koncentraciji encima. Naraščanje hitrost encimske reakcije z naraščanjem koncentracije substrata je možna do določene točke. Najvišja aktivnost, maksimalna hitrost reakcije, je dosežena, ko je celotna količina encima nasičena s substratom. Na začetku kompleks ES šele nastaja in se začne zaradi hkratnega razpadanja ES takoj tudi zmanjševati. Po določenem času se hitrost razpada in nastanka ES izenačita, pravimo, da je doseženo dinamično ravnotežje (angl. *steady state*). Takrat je dosežena maksimalna hitrost nastajanja produkta. Če koncentracijo substrata še povečujemo, se hitrost reakcije ne poveča, ker se vse več encima nahaja v obliki kompleksa ES, kar pomeni, da encim postaja nasičen s substratom.

Na samo hitrost nastanka kompleksa encim-substrat oz. na vezavo substrata z encimom vpliva specifičnost in dostopnost substrata (Berg idr. 2002).

Michaelis-Mentenov graf (vpliv koncentracije substrata na hitrost encimske reakcije)



Slika 16. Michaelis-Mentenov graf.

Hitrost encimske reakcije kot funkcija koncentracije substrata pogosto sledi Michaelis-Mentenovemu modelu. Njun model ima obliko enačbe, ki opisuje hitrost encimskih reakcij kot odvisnost hitrosti encimske reakcije (v_0) od koncentracije substrata $[S]$.

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$[S]$ = koncentracija substrata (mM), v_0 = začetna hitrost encimske reakcije ($\mu\text{mol}/\text{L} \cdot \text{min}$), $v_{\max}$ = maksimalna hitrost encimske reakcije ($\mu\text{mol}/\text{L} \cdot \text{min}$), K_M = Michaelisova konstanta (mM).

Kinetični konstanti: maksimalna hitrost ($v_{\max}$) in Michaelisova konstanta (K_M)

Maksimalna hitrost je limitirajoča hitrost pri velikih koncentracijah substrata in je izražena kot koncentracija produkta, ki pri encimsko katalizirani reakciji nastane na minuto.

Pri vplivu koncentracije substrata na začetno hitrost reakcije vidimo, da je pri majhnih koncentracijah odvisnost linearna, pri velikih pa postane hitrost konstantna in sicer kar maksimalna. V Michaelis-Mentenovem grafu se krivulja, ki prikazuje odvisnost hitrosti encimske reakcije od koncentracije substrata, asimptotično približuje maksimalni hitrosti.

Kinetične lastnosti encima lahko opišemo s pomočjo koncentracije substrata, pri kateri je začetna hitrost reakcije enaka polovici maksimalne vrednosti ($v_{\max}/2$). Koncentracija substrata, pri kateri je hitrost reakcije enaka $v_{\max}/2$, je definirana kot Michaelisova konstanta (K_M). Pri tej koncentraciji je zapolnjena polovica aktivnih mest encima. Michaelisova konstanta je izražena kot koncentracija z enoto mol/l .

Najbolj preprost model za razumevanje pomena Michaelisove konstante je Michaelis-Mentenov model, kjer se v prvi reakciji substrat reverzibilno veže na encim in v drugi reakciji nastanejo produkti.



V prvi reakciji nastali kompleks ES v večini primerov ni mogoče meriti. Običajno merimo nastanek produktov v drugi reakciji. Iz modela zato izpeljemo enačbo, ki opisuje hitrost encimske aktivnosti (količino produkta, tvorjenega v časovnem intervalu) v odvisnosti od koncentracije substrata.

Hitrost nastajanja produkta je enaka hitrosti, s katero kompleks ES razpade v E + P, in je enaka produktu hitrostne konstante (k_2) in koncentraciji kompleksa encim-substrat [ES]. Ker ne poznamo koncentracije kompleksa ES, si za izračun pomagamo z dvema predpostavkama. Prvič, predpostavimo, da je koncentracija ES v dinamičnem ravnovesju v časovnih intervalih, ki se uporabljajo za določanje encimske aktivnosti. To pomeni, da je stopnja tvorbe ES enaka stopnji disociacije ES (bodisi nazaj na E + S ali naprej na E + P). Drugič, predpostavimo, da je obratna reakcija (nastanek ES iz E + P) zanemarljiva, saj delamo v zgodnjih časovnih intervalih, kjer je koncentracija produkta zelo nizka (Nelson idr., 2008).

Stopnja tvorbe ES = stopnja disociacije ES

$$k_1 \cdot [S] \cdot [E_p] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$$

Če vemo, da je celotna koncentracija encima $[E_t] = \text{vezan encim } [ES] + \text{prosti encim } [E_p]$, lahko zgornjo enačbo zapišemo:

$$k_1 \cdot [S] \cdot ([E_t] - [ES]) = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$$

Nato iz enačbe izpostavimo [ES]:

$$[ES] = \frac{k_2 \cdot [E_t] \cdot [S]}{k_1 \cdot [S] + k_2 + k_{-1}} = \frac{[E_t] \cdot [S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1}$$

Hitrost encimske reakcije smo definirali kot: $v = k_2 \cdot [ES]$

Hitrost encimske reakcije

$$k_2 \cdot [ES] = \frac{k_2 \cdot [E_t] \cdot [S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1}$$

Začetna hitrost encimske reakcije je definirana kot $k_2 \cdot [ES]$. Definiramo še $v_{\max}$ (hitrost pri maksimalni koncentraciji substrata) kot $k_2 \cdot [E_t]$ in Michaelisovo konstanto K_M kot $(k_2 + k_{-1})/k_1$ in vnesemo kinetični konstanti v zgornjo enačbo:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Michaelisova konstanta K_M ni samo konstanta, ki meri moč vezave med encimom in substratom, njena vrednost vključuje tako afiniteto substrata za encim, kot hitrost, s katero se vezan substrat pretvori v produkt. Samo v primeru, če je k_2 precej manjša od k_{-1} , bo K_M enaka afiniteti vezave substrata z encimom.

Velikost K_M je različna za različne pare encim-substrat, odvisna pa je tudi od reakcijskih pogojev (T , pH, ionska moč ...). Če imata določen encim in substrat majhno K_M , potem doseže encim

maksimalno katalizno učinkovitost že pri nizkih koncentracijah substrata. V tem primeru ima encim do tega substrata veliko afiniteto (Nelson idr., 2008).

Merjenje encimsko katalizirane reakcije

Merjenje encimske aktivnosti izvajamo v laboratoriju s pomočjo encimskih testov. Laboratorijski testi so bistvenega pomena za študij encimske kinetike in inhibicije encimov.

Predpostavke encimskih kinetičnih analiz pri enostavni Michaelis-Mentenovi kinetiki:

- Med testom je nastajanje produkta linearno (izberemo kratke časovne intervale).
- Koncentracija substrata močno preseže koncentracijo encima. To pomeni, da je koncentracija substrata konstantna med vsem testom.
- Vsak encim tvori produkt.
- Spontano nastajanje produkta, brez encima, je zanemarljivo (brez neencimske reakcije).
- Brez kooperacije. Vezava substrata na vezavno mesto encima ne vpliva na afiniteto ali aktivnosti na sosednjem mestu.
- Niti substrat niti produkt ne delujeta kot alosterični modulator, ki lahko spremeni hitrost encimske reakcije.

Hitrost encimske reakcije

Delovanje encimov lahko določimo z merjenjem hitrosti izginjanja substrata (S) ali hitrostjo nastajanja produktov (P) pri določenih konstantnih pogojih (koncentracija substrata, temperatura, pH). Če merimo koncentracijo nastajanja produkta v nekem časovnem intervalu, lahko tako določimo hitrost encimske reakcije. Hitrost encimske reakcije je podana z naraščanjem koncentracije produkta na minuto.

Test encimsko katalizirane reakcije lahko izvedemo z merjenjem začetne hitrosti reakcije. Encimu dodamo substrat v prebitku, tako da vzpostavimo dinamično ravnotežje, kjer je koncentracija kompleksa encim-substrat približno konstantna. Hitrost reakcije merimo v kratkem času po vzpostavitvi dinamičnega ravnotežja. Običajno v vzorcih zaustavimo encimsko reakcijo in izmerimo koncentracijo produktov, ki so nastali v časovni enoti.

Koncentracijo produkta, ki nastane pri encimsko katalizirani razgradnji substrata, lahko merimo spektrofotometrično. Iz znane absorbanca izračunamo koncentracijo nastalega produkta s pomočjo Beer-Lambertovega zakona (če je molarni absorpcijski koeficient znan) (Nelson idr., 2008).

Določanje koncentracije produkta z merjenjem absorbance

$$[P] = \frac{A_{\lambda}}{\epsilon \cdot l} \quad (\mu\text{mol/l})$$

[P] = molarna koncentracija produkta ($\mu\text{mol/l}$), A = absorbanca, ϵ = molarni absorpcijski koeficient ($\text{l/mol} \cdot \text{cm}$), l = dolžina optične poti (cm), λ = valovna dolžina (nm)

Hitrost encimske reakcije

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{A_{\lambda}}{\epsilon \cdot l \cdot t} \quad (\mu\text{mol/l} \cdot \text{min})$$

Encimska aktivnost

Količino encima izražamo kot encimsko aktivnost. Encimska aktivnost je definirana kot količina encima, ki katalizira pretvorbo 1 μmol substrata na minuto, pri določenih pogojih (temperatura, pH, koncentracija substrata). Enota encimske aktivnosti je $U = 1 \mu\text{mol/min}$ (μmol se nanaša na količino pretvorjenega substrata).

Encimsko aktivnost dobimo, če hitrost encimske reakcije pomnožimo z volumnom vzorca, uporabljenega v reakciji (Nelson idr., 2008).

Encimska aktivnost

$$\text{Encimska aktivnost} = \text{hitrost encimske reakcije } (v) \cdot \text{volumen vzorca } (V_v) \text{ } (\mu\text{mol/min})$$

Specifična aktivnost

Določanje koncentracije nastalih produktov oz. encimsko aktivnost uporabimo tudi kot kontrolo učinkovitosti izolacije encima iz bioloških tkiv.

Ker čiščenje encima (protein) vključuje selektivno izločanje proteinov, je treba v posamezni fazi izolacije testirati količino prisotnih proteinov in encimsko aktivnost. Merjenje encimske aktivnosti na miligram celotnih proteinov nam po navadi pove stopnjo čistosti encima v posameznih frakcijah. Encimski aktivnosti na miligram celotnih proteinov pravimo specifična aktivnost. Enota specifične aktivnosti je U/mg .

Odstotek čistosti

Odstotek čistosti (stopnja očiščenja) nam pove, kako uspešni smo pri izolaciji encima oz. kako čist je encim v posamezni fazi izolacije. Odstotek čistosti = (specifična aktivnost vzorca/specifična aktivnost prve frakcije) $\cdot 100$.

$$\text{Hitrost encimske reakcije } (v) = \text{koncentracija produkta/min } (\mu\text{mol/l} \cdot \text{min})$$

$$\text{Encimska aktivnost} = \text{množina produkta/min } (\mu\text{mol/min}) \text{ oz. } (U)$$

$$\text{Specifična aktivnost} = \text{encimska aktivnost/celotni proteini } (U/\text{mg})$$

$$\text{Odstotek čistosti} = (\text{specifična aktivnost vzorca/specifična aktivnost prve frakcije}) \cdot 100 \text{ } (\%)$$

S poznavanjem delovanja encima lahko načrtujemo in razumemo pogoje, potrebne za kontroliranje encimov. S spreminjanjem temperature, pH vrednosti in koncentracije substrata oz. z dodajanjem inhibitorjev ali aktivatorjev lahko moduliramo hitrost encimske reakcije (Berg idr., 2002)

Dejavniki, ki jih je treba nadzirati pri encimskih testih

Nasičenje s substratom

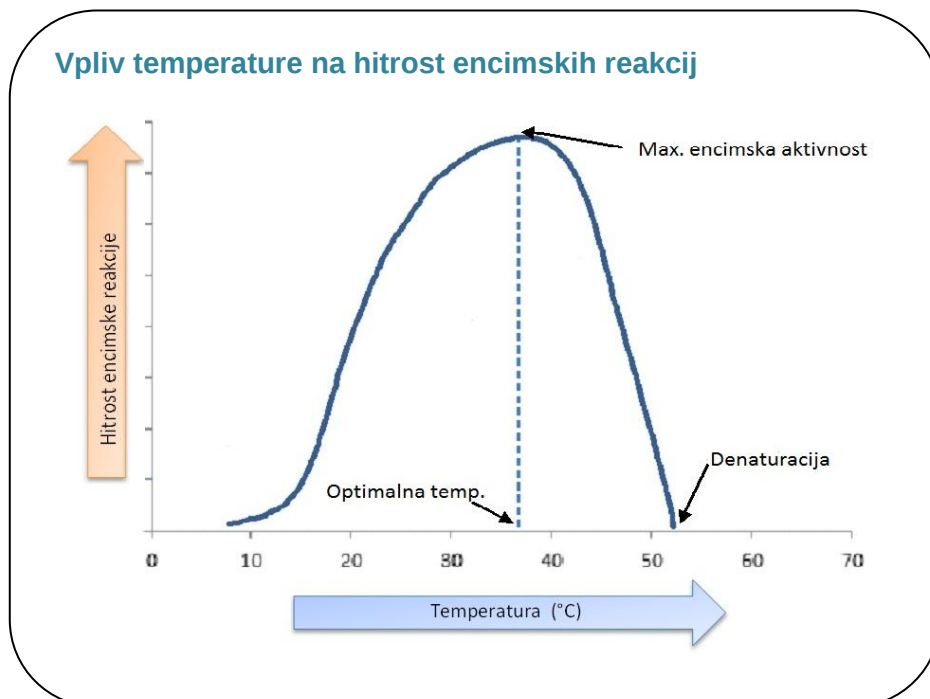
Nasičenje encima s substratom omejuje hitrost reakcije. V točki nasičenja se hitrost reakcije ne more povečati, četudi povečujemo koncentracijo substrata. Takrat dosežemo v_{max} .

Koncentracija soli

Previsoke koncentracije soli vplivajo na zmanjšanje encimske aktivnosti. Večina encimov lahko deluje v koncentracijskem območju soli 1–500 mM.

Vpliv temperature na hitrost encimskih reakcij

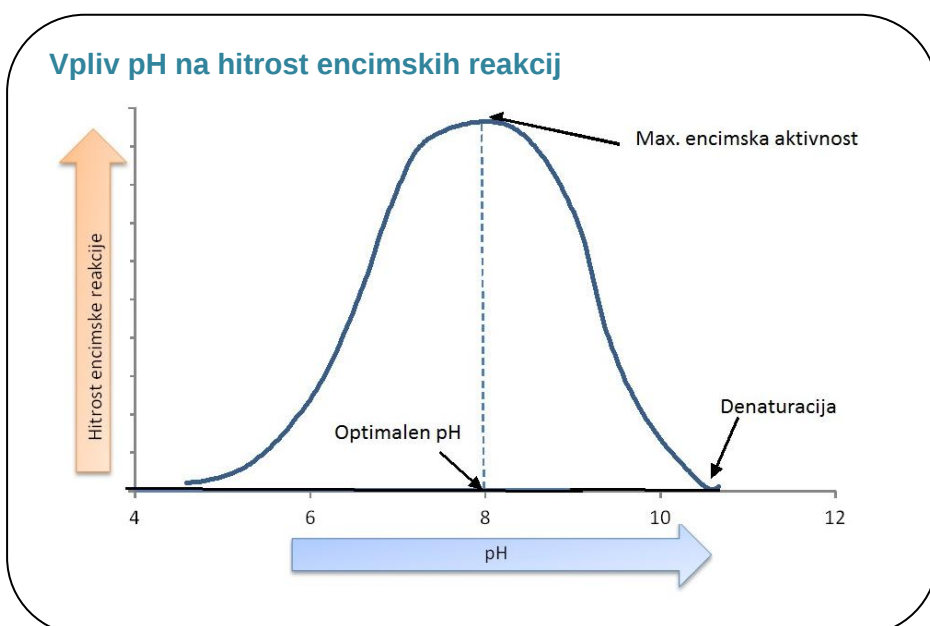
Pri nizkih temperaturah so encimi manj aktivni. S poviševanjem temperature se reakcijska hitrost povečuje do optimalne temperature. Maksimalno reakcijsko hitrost dosežemo pri optimalni temperaturi delovanja encima (npr. za večino živalskih encimov okrog 37 °C). Z nadaljnjim poviševanjem temperature reakcijska hitrost naglo upada in aktivnost encima preneha z njegovo denaturacijo.



Slika 17. Primer vpliva temperature na hitrost encimske reakcije (tripsin).

Vpliv pH na hitrost encimskih reakcij

Optimalno delovanje oz. največjo encimsko aktivnost pri večini encimov dosežemo pri optimalni vrednosti pH (večinoma v rahlo kislih ali bazičnih pogojih). Pri visokih ali nizkih vrednostih pH encimi izgubijo svojo aktivnost. Ekstremne vrednosti pH uničijo terciarno strukturo, kar pomeni, da encimi denaturirajo.



Slika 18. Primer vpliva pH na hitrost encimske reakcije (tripsin).

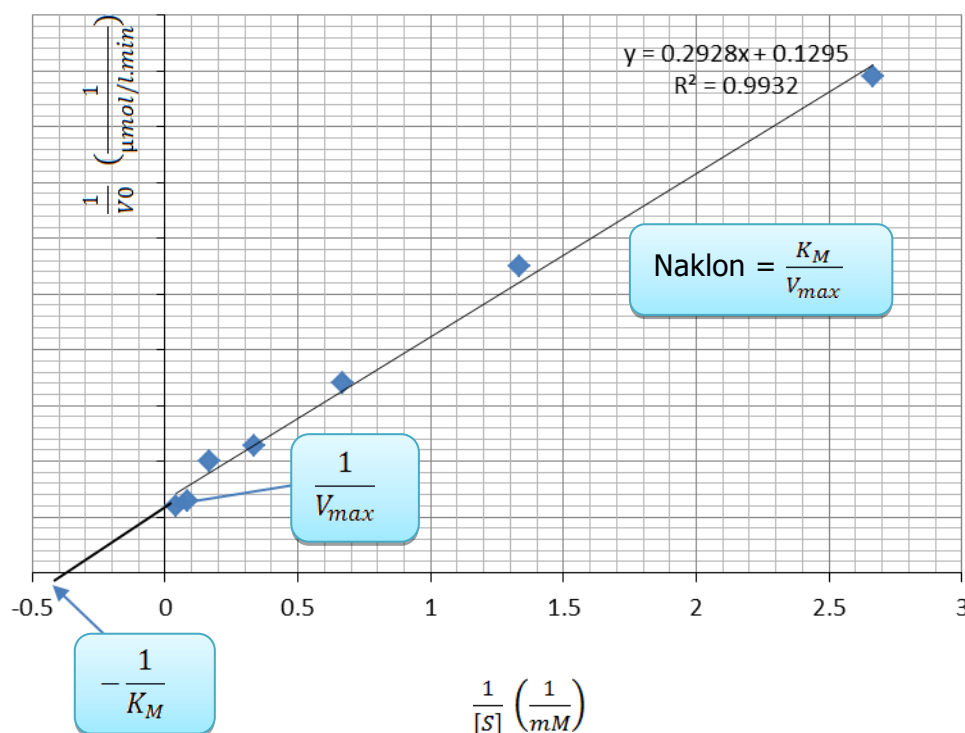
Ekperimentalno določanje kinetičnih konstant ($v_{\max}$ in K_M)

Karakterizacija encimsko katalizirane reakcije vključuje eksperimentalno določanje kinetičnih konstant v *steady state* pogojih. Te konstante so določene s pomočjo študij kinetike in vključujejo maksimalno hitrost ($v_{\max}$) encimsko katalizirane reakcije, kjer je aktivno mesto encima nasičeno s substratom, in Michaelisovo konstanto (K_M), to je koncentracijo substrata, pri kateri je hitrost reakcije enaka polovici maksimalne hitrosti.

Za določanje kinetičnih konstant za posamezen par encim-substrat pripravimo serijo poskusov, v katerih merimo hitrost nastajanja produktov pri dani začetni koncentraciji substrata. Hitrost nastajanja produktov spremljamo z merjenjem koncentracije produktov v odvisnosti od časa. Poskus se ponovi za različne začetne koncentracije substrata (pri konstantni koncentraciji encima) in se določi hitrost nastajanja produktov za vsako od teh koncentracij substrata. Iz te serije poskusov dobimo nabor podatkov: reakcijske hitrosti (v) v odvisnosti od koncentracije substrata $[S]$, iz katerih lahko narišemo Michaelis–Mentenovo krivuljo.

Iz samega Michaelis-Mentenovega grafa težko določimo $v_{\max}$, ker se krivulja asimptotično približuje maksimalni vrednosti, dejansko jo skoraj nikoli ne doseže. Zaradi tega, za grafično določanje kinetičnih konstant, Michaelis-Mentenovo krivuljo lineariziramo. Najbolj priljubljena metoda linearizacije je Lineweaver-Burkova. Graf prikazuje linearno odvisnost recipročne vrednosti začetne hitrosti encimsko katalizirane reakcije od recipročne vrednosti koncentracije substrata. Iz dobljene linearne odvisnosti lahko s pomočjo enačbe premice določimo kinetični konstanti $v_{\max}$ in K_M za določen par encim-substrat. Premica ima naklon enak vrednosti $K_M/v_{\max}$, presečišče ordinatne osi $1/v_{\max}$ in presečišče abscisne osi $-1/K_M$ (Berg idr., 2002).

Lineweaver-Burkov graf



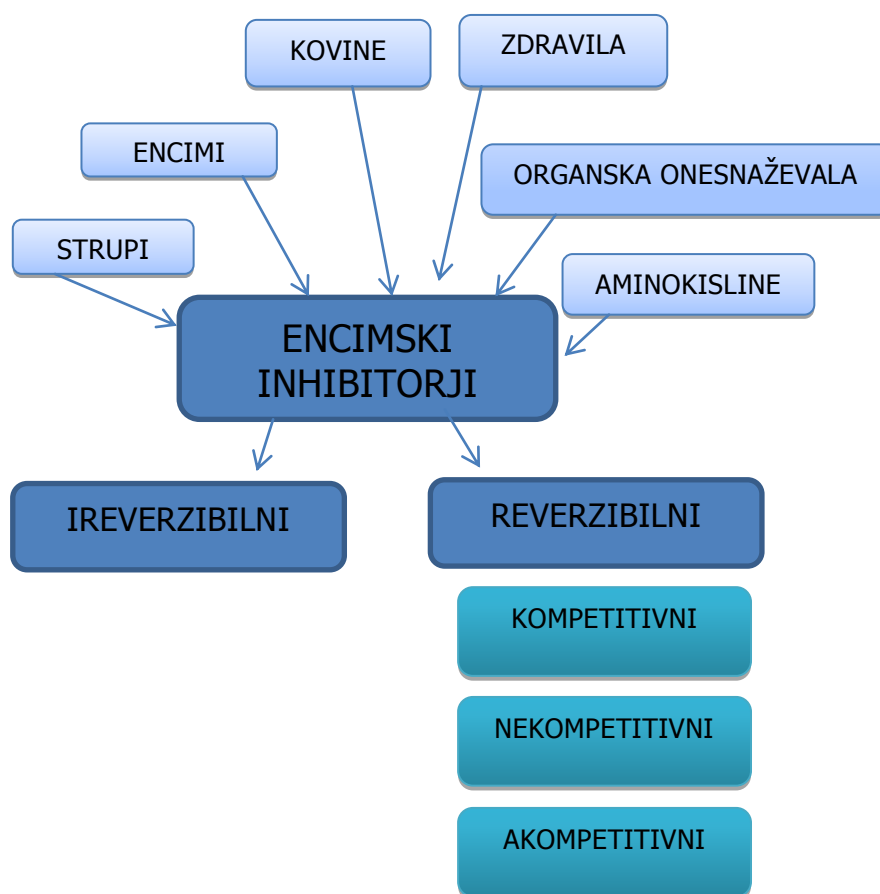
Slika 19. Primer Lineweaver-Burkovega grafa za encimsko reakcijo.

ENCIMSKA INHIBICIJA

Zmanjšano ali zaustavljeno katalitično delovanje encima.

Encimski inhibitorji so snovi, ki spreminjajo katalitično delovanje encima, tako da upočasnijo ali v nekaterih primerih ustavijo katalizo. Učinek inhibicije je lahko začasen ali stalen (reverzibilna ali ireverzibilna inhibicija). Encimski inhibitorji so lahko produkti metabolnih reakcij v telesu, strupi (toksini), zdravila, organska onesnaževala, kovinski ioni in različne druge kemijske spojine.

Encimske inhibitorje ločimo glede na način delovanja (ireverzibilni ali reverzibilni). Reverzibilne inhibitorje ločimo glede na način vezave (kompetitivna, akompetitivna in nekompetitivna), kot je prikazano v spodnjem diagramu:



Slika 20. Encimski inhibitorji, njihovo delovanje in način vezave.

Ireverzibilni inhibitor se na encim močno veže bodisi s kovalentnimi ali nekovalentnimi vezmi in od njega zelo počasi disociira. Inhibitor se veže na funkcionalno skupino aminokisline, ki sodeluje pri vezavi substrata ali pri katalitičnem delovanju, in tako inaktivira encim.

Reverzibilni inhibitorji se vežejo na encim, vendar od njega disociirajo v najkrajšem možnem času. Encim je torej neaktiven le takrat, ko je reverzibilni inhibitor vezan nanj (Berg idr., 2002).

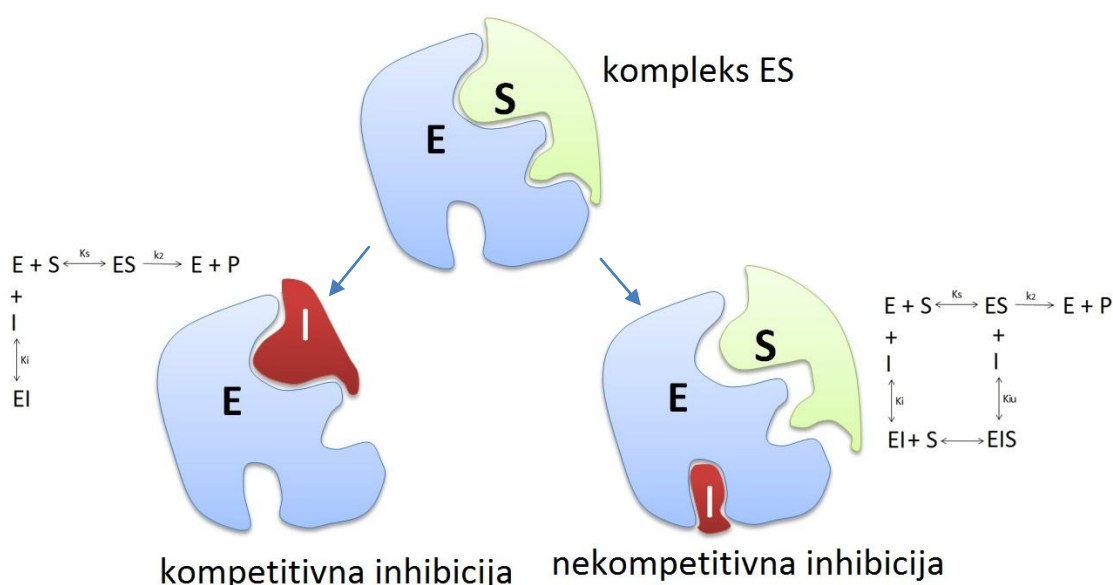
Tipi inhibicij glede na način vezave inhibitorja

Kompetitivna inhibicija. Pri kompetitivni inhibiciji, encim lahko veže ali substrat (tvori kompleks ES) ali inhibitor (EI), ne pa oba hkrati (ESI). Kompetitivni inhibitorji se vežejo na aktivno mesto encima. Po obliki so navadno zelo podobni substratu in s substratom tekmujejo za aktivno mesto na encimu. Moč inhibicije je odvisna od razmerja koncentracij substrata in inhibitorja ter od afinitete encima za vezavo vsakega od njiju. Pri zelo visokih koncentracijah substrata je učinek inhibitorja zanemarljiv, razen v primeru ko je afiniteta inhibitorja za vezavo na encim veliko večja od afinitete vezave substrata. Pri vezavi inhibitorja na encim nastane kompleks EI, iz katerega ne morejo nastati produkti, saj molekula inhibitorja nima ustreznih funkcionalnih skupin, tistih, na katere deluje encim v primeru, ko je nanj vezan substrat. Pri kompetitivni inhibiciji se $v_{\max}$ ne spremeni (v primerjavi z reakcijo brez inhibitorja), saj se z naraščanjem koncentracije substrata zmanjšuje učinek inhibitorja in je zato pri maksimalni hitrost vpliv inhibitorja zanemarljiv. Z vezavo kompetitivnega inhibitorja na aktivno mesto encima se zmanjša število vezav substrata na ta encim. Rezultat je povečana K_M , zaradi zmanjšane afinitete encima za substrat.

Nekompetitivna inhibicija. Pri nekompetitivni inhibiciji se lahko substrat in inhibitor hkrati vežeta na molekulo encima, vendar na različni vezavni mesti. Vezava nekompetitivnega inhibitorja ne vpliva na hitrost vezave substrata na encim, vpliva pa na katalitično delovanje encima (aktivnost encima). Nekompetitivni inhibitor se veže na alosterično mesto encima (običajno različno od aktivnega mesta) in spremeni obliko encima, tako da četudi se substrat lahko veže, aktivno mesto takrat ni učinkovito. Produkti nastanejo šele, ko inhibitor disociira od encima.

Z vezavo inhibitorja na encim se zmanjša koncentracija encimov, razpoložljivih za ustrezno katalizo. Manj funkcionalnih encimov pomeni manj razpoložljivih aktivnih mest in s tem manjšo $v_{\max}$ oz. zmanjšano hitrost encimske reakcije. Maksimalne hitrosti katalitične reakcije ne moremo doseči, četudi povečamo koncentracijo substrata. Michaelisova konstanta ostane enaka, saj se substrat lahko veže na encim z enako hitrostjo kot v reakciji brez inhibitorja (Nelson idr., 2008).

Kompetitivni in nekompetitivni inhibitor



Slika 21. Vezavno mesto inhibitorja pri kompetitivni in nekompetitivni inhibiciji.

Akompetitivna inhibicija

Akompetitivni inhibitor je podoben nekompetitivnemu, saj prav tako dopušča vezavo substrata na aktivno mesto, vendar se od njega razlikuje, ker se veže le na kompleks encim-substrat (ES). Ker se inhibitor veže le na kompleks ES in ne na prosti encim, bo vplival na encimsko aktivnost le pri visoki koncentraciji substrata, ko bo tudi koncentracija kompleksa ES visoka (Nelson idr., 2008).

Določanje kinetičnih konstant ($v_{\max}$ in K_M) pri kompetitivni in nekompetitivni inhibiciji

Kompetitivna in nekompetitivna inhibicija se kinetično razlikujeta. Ugotavljanje, ali reverzibilni inhibitor deluje s kompetitivno ali nekompetitivno inhibicijo, je mogoče z eksperimentalnim določanjem kinetičnih konstant. Merimo hitrosti encimskih reakcij pri različnih koncentracijah substrata in inhibitorja (delamo le z encimi, ki izkazujejo Michaelis-Mentenovo kinetiko).

Pri kompetitivni inhibiciji, kjer inhibitor tekmuje s substratom za aktivno mesto, je disociacijska konstanta za inhibitor podana z enačbo:

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

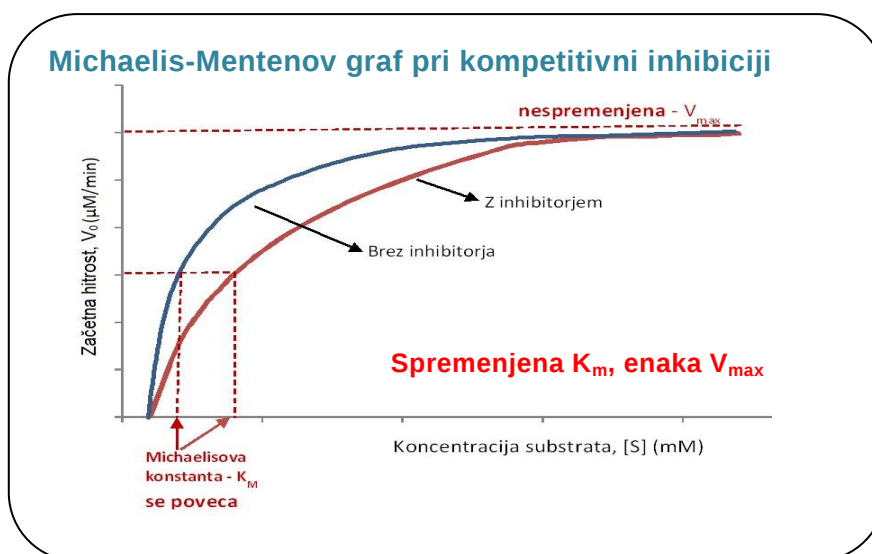
Ker je kompetitivno inhibicijo mogoče odpraviti z dovolj visoko koncentracijo substrata, je lahko v prisotnosti inhibitorja dosežena $v_{\max}$ enaka kot $v_{\max}$ v reakciji brez inhibitorja. Drugače velja za vrednost K_M . V prisotnosti kompetitivnega inhibitorja se navidezna vrednost K_M poveča. To novo vrednost K_M , ki se imenuje αK_M , matematično zapišemo kot:

$$\alpha K_M = K_M \left(1 + \frac{[I]}{[K_i]} \right)$$

kjer je $[I]$ koncentracija inhibitorja in K_i disociacijska konstanta za kompleks encim-inhibitor. S povečevanjem vrednosti $[I]$ narašča vrednost αK_M . V prisotnosti kompetitivnega inhibitorja bo encim imel enako $v_{\max}$ kot v odsotnosti inhibitorja. Michaelis-Mentenova enačba postane tako:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

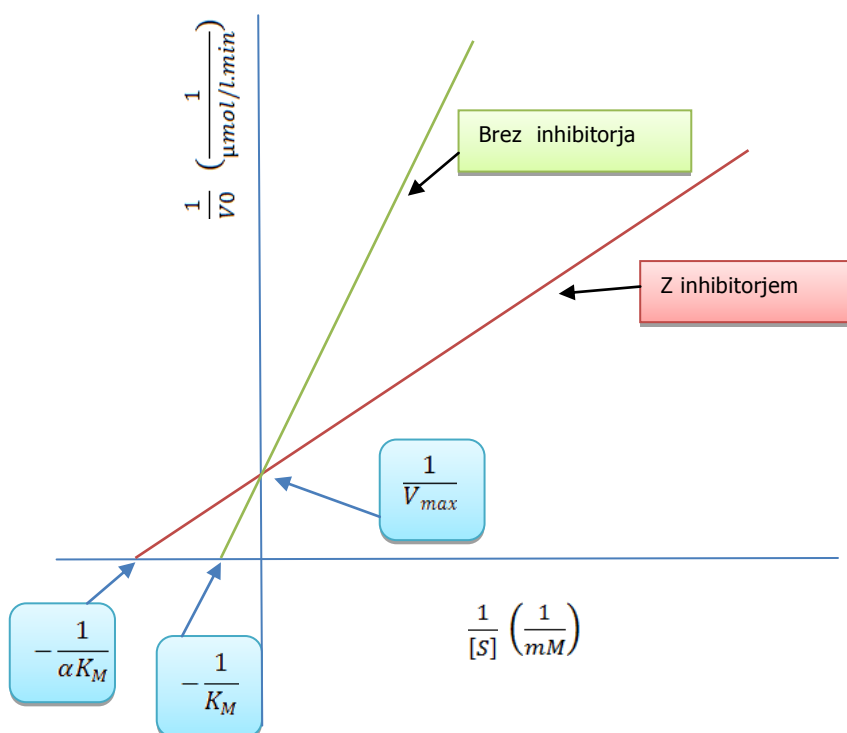
Michaelis-Mentenov graf pa je takšen:



Slika 22. Michaelis-Mentenov graf pri kompetitivni inhibiciji.

Za eksperimentalno določanje kinetičnih konstant pripravimo serijo poskusov, v katerih merimo hitrost nastajanja produktov pri različnih začetnih koncentracijah substrata. Serijo pripravimo za encimsko reakcijo brez inhibitorja (serija A) in enako ponovimo še za reakcijo z inhibitorjem (serija B). Iz te serije poskusov dobimo nabor podatkov: reakcijske hitrosti (v – za serijo A in B) v odvisnosti od koncentracije substrata $[S]$, iz katerih lahko narišemo Michaelis–Mentenovo krivuljo oz. Lineweaver-Burkov graf. Iz enačb premic izračunamo kinetični konstanti $v_{\max}$ in K_M za encimsko reakcijo brez inhibitorja ter $v_{\max}$ in αK_M za encimsko reakcijo z inhibitorjem (Berg idr., 2002).

Lineweaver-Burkov graf pri kompetitivni inhibiciji

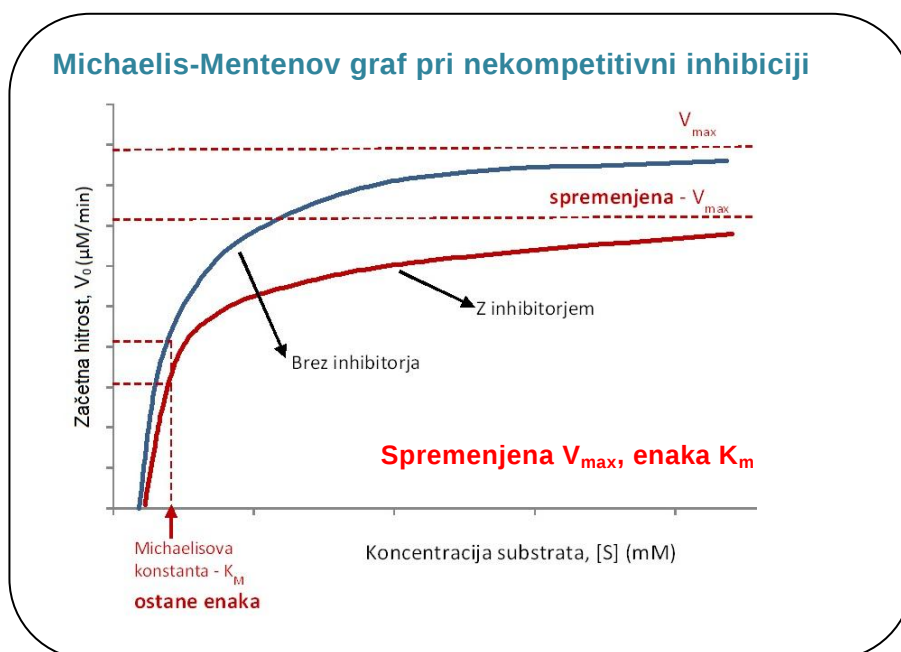


Slika 23. Lineweaver-Burkov graf pri kompetitivni inhibiciji.

Nekompetitivna inhibicija je posebna oblika mešane inhibicije, kjer se inhibitor veže na mesto, ki je različno od aktivnega mesta za substrat. Veže se lahko bodisi na E ali ES. V primeru nastalega kompleksa ESI ne morejo nastati produkti. Vrednost $v_{\max}$ se zato zniža na novo navidezno vrednost $v_{\max}/\alpha$, medtem ko vrednost K_M ostane nespremenjena. Nekompetitivne inhibicije ni mogoče odpraviti s povečanjem koncentracija substrata. Michaelis-Mentenova enačba postane tako:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{\alpha(K_M + [S])}$$

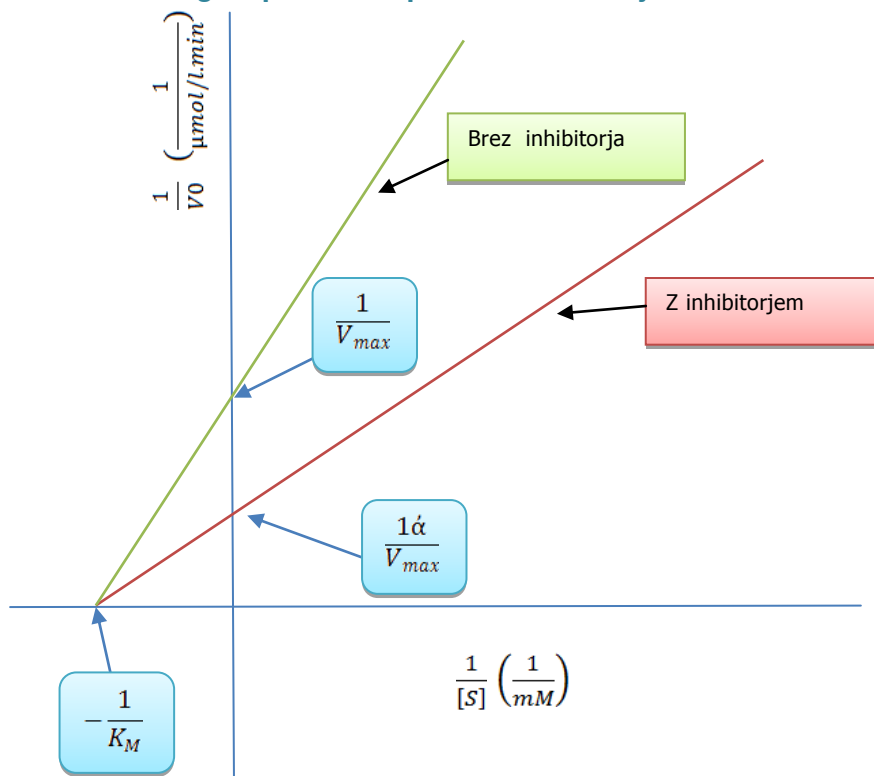
Michaelis-Mentenov graf pa je takšen:



Slika 24. Michaelis-Mentenov graf pri nekompetitivni inhibiciji.

Kinetični konstanti eksperimentalno določimo enako kot pri kompetitivni inhibiciji. Iz te serije poskusov dobimo nabor podatkov: reakcijske hitrosti (v – za serijo A in B) v odvisnosti od koncentracije substrata $[S]$, iz katerih lahko narišemo Michaelis–Mentenovo krivuljo oz. Lineweaver-Burkov graf. Iz enačb premic izračunamo kinetični konstanti $v_{\max}$ in K_M za encimsko reakcijo brez inhibitorja ter $v_{\max}/\alpha$ in K_M za encimsko reakcijo z inhibitorjem (Berg idr., 2002).

Lineweaver-Burkov graf pri nekompetitivni inhibiciji



Slika 25. Lineweaver-Burkov graf pri nekompetitivni inhibiciji.

Vloga naravnih in umetno izdelanih encimskih inhibitorjev

Encimske inhibitorje lahko najdemo v naravi ali jih umetno izdelamo. Naravni encimski inhibitorji sodelujejo v presnovnih procesih v živih bitjih. V naravi encimski inhibitorji delujejo pogosto kot toksini, ki so se razvili za obrambo rastlin ali živali pred plenilci. Ti naravni toksini vključujejo nekatere od najbolj znanih strupenih snovi (npr. terpenoidi, alkaloidi, nevrotoksini). Umetni inhibitorji se pogosto uporabljajo kot zdravila, lahko pa tudi kot insekticidi, herbicidi ali razkužila.

Encimski inhibitorji v regulaciji presnove

Encimi pospešujejo hitrost presnovnih reakcij tudi za faktor 10^6 . Njihovo delovanje je ključnega pomena za življenje, vendar je ravno zaradi takšne hitrosti encimska aktivnost v organizmih strogo nadzorovana. Pogosto so presnovni procesi sestavljeni iz verige reakcij, od katerih je vsaka stopnja katalizirana z drugim encimom. Te verige reakcij imenujemo presnovne poti. V večini primerov končni produkt presnovne poti (metabolit) deluje kot nekompetitivni inhibitor za encim v predhodni stopnji na tej poti. Dober primer je alosterična regulacija glikolize. V tej katabolni poti se porablja glukoza in proizvajajo ATP, NADH in piruvat. Ključni korak regulacije nastopi že v zgodnji fazi glikolize pri reakciji, ki je katalizirana z encimom fosfofruktokinaza-1. Ko koncentracija ATP naraste, se ATP veže na alosterično mesto encima in tako zmanjša hitrost encimske reakcije. Glikoliza je tako inhibirana in produkcija ATP se zaustavi. Ta negativna povratna zanka pomaga vzdrževati stalno koncentracijo ATP v celici. Vzdrževanje homeostaze v celicah (urejanje presnovnih poti) je regulirano tako z inhibicijo kot aktivacijo encimov.

Encimski inhibitorji kot zdravila

Mnoge molekule zdravil so encimski inhibitorji, zato je njihov razvoj in izboljšave aktivno področje raziskav v biokemiji in farmakologiji. Encimski inhibitor v vlogi zdravila se pogosto ocenjuje po svoji specifičnosti in njegovi moči. Zagotoviti je treba visoko specifičnost in jakost, da bo zdravilo imelo malo stranskih učinkov in s tem nizko toksičnost. Zaviranje delovanja encima ima lahko za posledico smrt patogena ali uravnavanje presnovnih neravnovesij.

Primeri ireverzibilnih encimskih inhibitorjev, ki se uporabljajo kot zdravila:

- antibiotiki (penicilin inhibira delovanje transpeptitaz);
- aspirin (acetilsalicilna kislina je ireverzibilni inhibitor ciklooksigenaze).

Primeri reverzibilnih kompetitivnih encimskih inhibitorjev, ki se uporabljajo kot zdravila:

- zdravila za HIV oz. viruse (proteazni inhibitorji);
- zdravljenje alkoholikov (inhibicija aldehyd oksidaze).

Primeri reverzibilnih nekompetitivnih encimskih inhibitorjev, ki se uporabljajo kot zdravila:

- antidepresivi (inhibicija monoamin oksidaze ali MAO);
- težke kovine.

Encimski inhibitorji kot toksične spojine

Veliko pesticidov (insekticidi, herbicidi, fungicidi, rodenticidi ...) je encimskih inhibitorjev. Npr. acetilholinesterazni pesticidi (organofosfati in karbamati) se ireverzibilno vežejo na aktivno mesto encima acetilholin-esteraze (AChE), ki hidrolizira nevrotansmitor acetilholin in tako onemogočijo razgradnjo acetilholina v njegove sestavne dele (holin in acetat). Acetilholin se kopiči v sinapsah in tako povzroča prekomerno vzdraženje na postinaptičnih receptorjih.

Mnogi drugi encimski inhibitorji se uporabljajo kot herbicidi. Njihovo delovanje temelji na inhibiciji encimov, potrebnih za biosintezo lipidov in karotenoidov ter procesov fotosinteze in oksidativne fosforilacije.

KOLORIMETRIČNA DETEKCIJA ZUNAJCELIČNEGA DOPAMINA

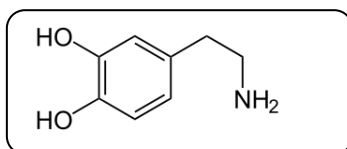
Določanje koncentracije dopamina.

Živčne prenašalce razdelimo glede na njihovo kemično strukturo na:

- aminokisline (glutamat, glicin, γ -aminomaslena kislina – GABA, aspartat);
- monoamine (adrenalin, noradrenalin, dopamin, serotonin, oktopamin);
- neuropeptide (endorfini, enkefalini);
- pline (dušikov oksid, ogljikov oksid).

Dopamin

Dopamin spada med biogene amine, in sicer med kateholamine, to je derivate aminokisline tirozina (slika 26). Je nevrottransmitor, ki aktivira dopaminske receptorje D1, D2, D3, D4 in D5. Dopamin nastaja v nadledvični žlezi in centralnem živčnem sistemu. Dopamin je tudi nevrohormon, ki ga sprošča hipotalamus. Njegova glavna hormonska funkcija je inhibicija sproščanja prolaktina iz sprednjega režnja hipofize. Biosinteza dopamina v telesu se začne s hidroksilacijo L-tirozina v L-DOPO (L-dihidroksifenilalanin) preko tirozin hidroksilaze in nadaljuje z dekarboksilacijo L-DOPE, ki jo katalizira encim DOPA dekarboksilaza. V nekaterih živčnih celicah se sinteza nadaljuje do noradrenalina in adrenalina, ki sta prav tako živčna prenašalca. V nevronih se dopamin po sintezi shranjuje v veziklih, od koder se z eksocitozo sprosti v sinaptično špranjo. Ko se prenese živčni impulz, se dopamin vrne v presinaptično celico, ter ponovno sodeluje pri prenosu signala ali pa ga kateholamin-O-metil-transferaza razgradi v homovanilično kislino. Encimska razgradnja lahko poteče tudi v sinaptični reži, pri čemer sodeluje monoamin oksidaza. Dopamin skupaj z ostalimi kateholamini (norepinefrin, metanefrine in normetanefrine) tvori ravnotežni kompleks, ki deluje skupaj v nadzoru krvnega tlaka, delovanja srca in nevroloških odzivov na zunanje in notranje dražljaje ter stres. Visoke in nizke ravni posamezne snovi tvorijo prilagojene odzive na dogodke (Pinel, 2009).



Slika 26. Strukturna formula dopamina

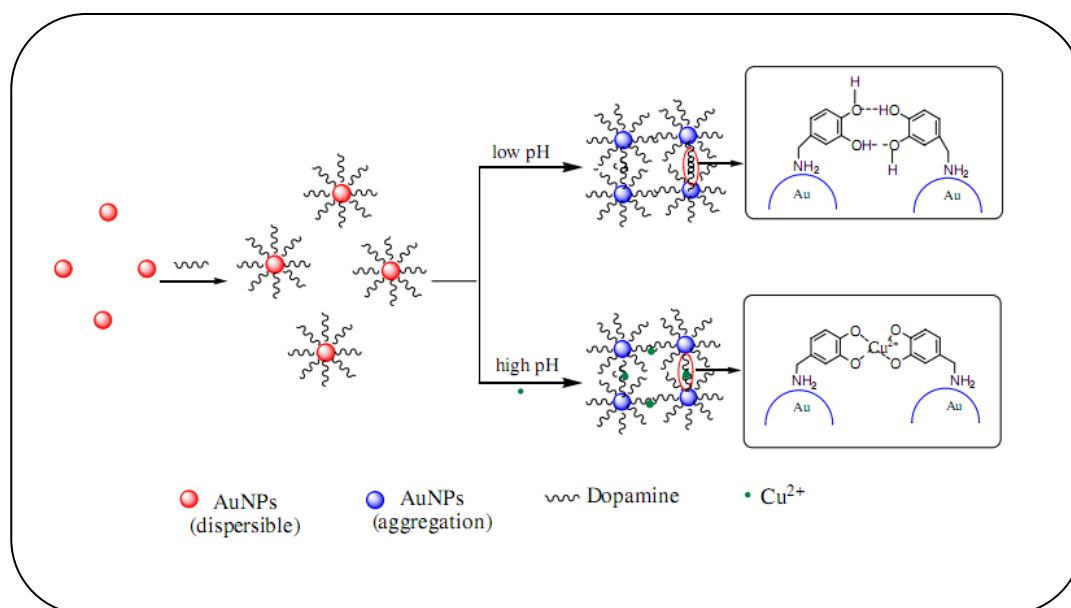
Določanje koncentracije zunajceličnega dopamina

Za proučevanje nevrottransmitorjev v možganih so razvite številne elektrokemične metode, ciklična voltometrija in drugi testi. Omenjeni testi so zelo specifični in občutljivi, vendar potrebujejo veliko časa in drago opremo. Ravno zaradi teh razlogov veliko novejših raziskav proučuje metode za enostavnejšo in hkrati občutljivo detekcijo zunajceličnega dopamina v možganih.

V članku z naslovom *Simple and sensitive detection of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid using gold nanoparticles as colorimetric probes* so avtorji Yuanfu Zhang, Baoxin Li in Xingling Chen predstavili novejšo metodo za kolorimetrično določanje dopamina z uporabo nanodelcev zlata (Zhang, Li, & Chen, 2010). Metoda temelji na agregaciji nanodelcev zlata ob prisotnosti dopamina (DA). Dopamin inducira združevanje nanodelcev zlata (AuNPs), kar povzroči spremembo barve od rdeče do vijolične ali modre. Združevanje je pospešeno ob prisotnosti bakrovih ionov, zlasti pri nizkih koncentracijah dopamina. Koncentracijo dopamina lahko kvantitativno določimo z uporabo UV-VIS spektrofotometra. Območje detekcije je nižje od 30 nM. Prednosti metode so njena visoka občutljivost, enostavnost in nizki stroški izvedbe (Zhang idr., 2010).

Proces agregacije AuNPs

Aminoskupina DA se v kemični interakciji hitro adsorbira na površino koloidnih delcev zlata. Pri nizkih pH vrednostih je združevanje nanodelcev rezultat vezave hidroksi skupine dveh sosednjih DA, ki se povežejo z vodikovimi vezmi. Pri visokih pH vrednostih, je hidroksi skupina ionizirana (negativno nabita), kar povzroči elektrostatski odboj med delci in disperzijo nanodelcev v mediju. Pospešeno združevanje nanodelcev zlata, v takšnem mediju lahko induciramo z dodatkom bakrovih ionov. V prisotnosti Cu^{2+} , hidroksi skupine dveh sosednjih DA tvorijo koordinacijsko vez z bakrovimi ioni.

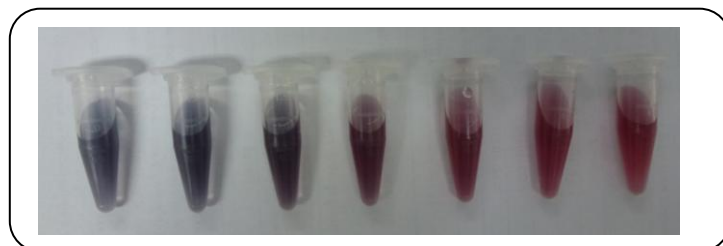


Slika 27. Določanje koncentracije DA na osnovi agregacije nanodelcev zlata (AuNPs). V odsotnosti Cu^{2+} je agregacija AuNP inducirana s povezovanjem DA z vodikovo vezjo. V prisotnosti Cu^{2+} DA lahko tvori koordinacijsko spojino (liganda sta v tem primeru hidroksilni skupini, Cu^{2+} pa centralni ion), ki inducira agregacijo AuNPs. Vir: Zhang idr (2010).

Kolorimetrična detekcija

Z naraščanjem koncentracije DA narašča koncentracija agregatov AuNPs in barva raztopine prehaja iz rdeče v temno vijoličasto ali modro (slika 28). Rdeča raztopina AuNPs ima svoj absorpcijski vrh pri valovni dolžini 520 nm, medtem ko ima vijoličasto modra raztopina z agregati AuNPs dva absorpcijska vrhova, enega pri 520 nm in drugega pri 670 nm (z zmanjševanjem oddaljenosti med delci prvi vrh postane šibkejši, medtem ko se drugi vrh pojača in premakne proti

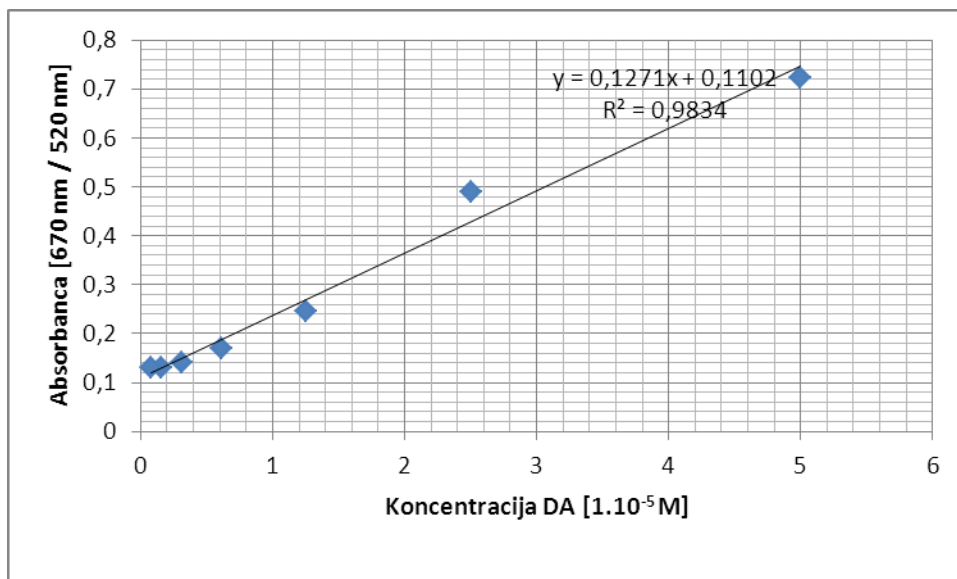
daljši valovni dolžini). Količina DA je proporcionalna nastalim agregatom AuNPs in tako absorpcijsko razmerje A_{670}/A_{520} narašča z naraščanjem koncentracije DA. Kolorimetrično detekcijo dopamina izvajamo z merjenjem absorbance raztopin, z UV-VIS spektrofotometrom. Metoda ni absolutna in je treba pripraviti umeritveno krivuljo. V epicah pripravimo serijo reakcij: najprej v vse epice dodamo raztopino AuNPs in nato v vsako epico dodamo standardno raztopino DA z različno koncentracijo (npr. $5 \cdot 10^{-5}$ M; $2,5 \cdot 10^{-5}$ M; $1,25 \cdot 10^{-5}$ M; $6,25 \cdot 10^{-6}$ M; $3,12 \cdot 10^{-6}$ M; $1,56 \cdot 10^{-6}$ M; $7,81 \cdot 10^{-7}$ M). Reakcijo pustimo teči 10 min, da dopamin inducira agregacijo AuNPs in nato raztopinam izmerimo absorbanco (Zhang idr., 2010).



Slika 28. Raztopine z agregiranimi AuNPs zlata, pripravljene za umeritveno krivuljo.

Na podlagi podatkov izmerjenih razmerij absorbanc A_{670}/A_{520} narišemo graf (umeritvena krivulja) odvisnosti absorbanc od znanih koncentracij dopamina.

Umeritvena krivulja za kolorimetrično določanje dopamina



Slika 29. Umeritvena krivulja za kolorimetrično določanje dopamina. Pripravljena je s koncentracijami standardne raztopine dopamina $5 \cdot 10^{-5}$ M; $2,5 \cdot 10^{-5}$ M; $1,25 \cdot 10^{-5}$ M; $6,25 \cdot 10^{-6}$ M; $3,12 \cdot 10^{-6}$ M; $1,56 \cdot 10^{-6}$ M; $7,81 \cdot 10^{-7}$ M.

Koncentracije DA v vzorcih z neznanimi koncentracijami DA določimo s pomočjo umeritvene krivulje. Vzorcem izmerimo absorbanco A_{670}/A_{520} in s pomočjo enačbe umeritvene krivulje izračunamo neznano koncentracijo dopamina v našem vzorcu.

LITERATURA

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman.
- Burgess, R. R., & Deutscher, M. P. (2009). *Guide to protein purification*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.
- Gel filtration: Principles and methods handbook*. (2002). Uppsala: Amersham Biosciences AB.
- Hage, D. S., & Cazes, J. (2005). *Handbook of affinity chromatography*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Ion exchange chromatography: Principles and methods*. (2004). Uppsala: Amersham Biosciences AB.
- Janson, J.-C. (2011). *Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Kelvinsong (2012). *Animal cell*. http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Animal_Cell.svg&oldid=137939389
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W. H. Freeman.
- Pinel, J. P. (2009). *Biopsychology*. Boston: Pearson.
- Protein electrophoresis: Technical manual*. (1999). Uppsala: Amersham Biosciences AB.
- Smith, B. J. (2002). Quantification of proteins on polyacrylamide gels. V J. M. Walker (Ur.), *The protein protocols handbook* (str. 237–242). Totowa, NJ: Humana.
- Switzer, R., & Garritty, L. F. (1999). *Experimental biochemistry*. New York: W. H. Freeman.
- Wenk, M. R., & Fernandis, A. Z. (2007). *A manual for biochemistry protocols*. Singapore: World Scientific.
- Zhang, Y., Li, B., & Chen, X. (2010). Simple and sensitive detection of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid using gold nanoparticles as colorimetric probes. *Microchimica Acta*, 168(1–2), 107–113. doi: 10.1007/s00604-009-0269-5