

# ***Eesti koolinoorte 49. bioloogiaolümpiaad***

## ***Biokeemia praktiline töö***

---



Eesnimi : .....

Perekonnanimi : .....

Kool : .....

Klass : .....

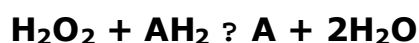
Rühm : .....

**Juhendajad : Kalle Kipper (TÜ MRI), Maarja Soomann (TÜ Arstiteaduskond)**

## Peroksüdaasi aktiivsuse määramine juur- ja puuviljades ning sealihas

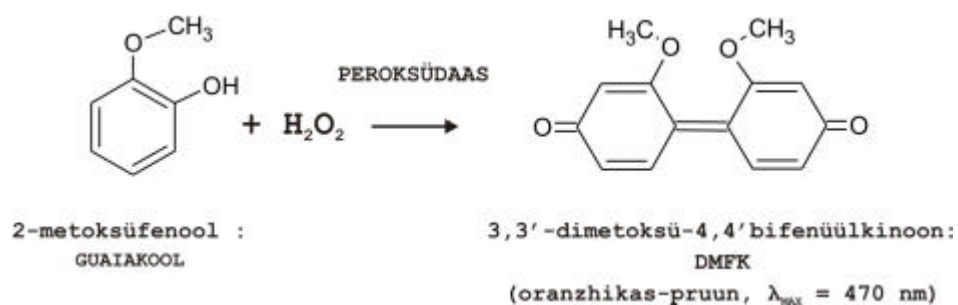
### Sissejuhatus

Peroksüdaas on ensüüm, mis katalüüsib taimedes erinevate orgaaniliste ühendite oksüdeerimist vesinikperoksiidi  $H_2O_2$  poolt järgmises reaktsioonis :



kus  $AH_2$  tähendab vastavalt reagenti redutseeritud ja  $A$  oksüdeeritud vormi. Peroksüdaasi üheks funktsiooniks rakus on ainevahetuse käigus tekkiva vesinikperoksiidi  $H_2O_2$  redutseerimine veeks. Elektronide doonori ehk redutseerijana võivad toimida erinevad taimsed ühendid, näiteks askorbiinhape, auksiin või mitmesugused fenoolsed ained.

Käesolevas praktikumis uurime peroksüdaasi aktiivsust erinevatest puu- ja juurviljadest ning sealihast pärit materjalis. Peroksüdaasi aktiivsuse mõõtmiseks kasutame redutseerijana orgaanilist ühendit guaiakool ehk 2-metoksüfenool, oksüdeerijana aga vesinikperoksiidi. Peroksüdaasi poolt katalüüsitud reaktsioonis oksüdeerub guaiakool  $H_2O_2$  juuresolekul keerulise nimega, kuid värviliseks orgaaniliseks ühendiks DMFK ehk 3,3'-dimetoksü-4,4'-bifenüülkinoon :



DMFK neelab valgust lainepikkusega 470 nm. Seetõttu on võimalik peroksüdaasi katalüüsitud reaktsiooni käiku spektrofotomeetria abil 470 nm juures jälgida. Mõõtes ka taimse materjali valgusisaldust, on võimalik hinnata erinevatest taimedest pärit peroksüdaasipreparatsiooni eriaktiivsust.

## Vajaminevad reagentid

- 50 mM Na-atseaat puhver (pH 5)
- 500 mM Na-atsetaat puhver (pH 5)
- 90 mM guaiakool (2-metoksüfenool)
- 10 mM DMFK (3,3'-dimetoksü-4,4'-bifenüülkinoon)
- 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- seerumin albumiin ehk BSA (1 mg/ml)
- Bradfordi reagent
- Redise/porgandi/õuna/sealiha ekstrakt

## Muud vahendid

- Automaatpipetid
- Pipeptiotsikud
- Mõõtsilindrid
- 1.5 ml mikrotsentrifuugi tuubid
- Koonilised kolvid
- Spektrofotomeetri küvetid
- Spektrofotomeetrid
- Kummikindad
- Riivid

## Praktiline osa

### 1. Ekstraktide valmistamine

Taimsest/loomsest materjalist ekstrakti valmistamine toimub 4 õpilasest koosnevates gruppides. Iga grupi liige valmistab ühe neljast ekstraktist.

Taimsete ekstraktide valmistamiseks riivige 10 g redist/porgandit/õuna küpsetusfooliumile ning tõstke riivitud materjal 100 ml koonilisse kolbi. Lisage materjalile 80 ml 50 mM Na-atsetaat puhvrit ning loksutage materjali umbes 1 min. Laske materjalil 5 min settida. Sette kohale jääv vedelik ongi edasistes katsetes vajalik ekstrakt. **Igaüks teist pipeteerib enda jaoks eraldi 1,5 ml tuubi 1 ml igat ekstrakti.**

Loomse ekstrakti tegemiseks tõstke lusikaga 1 g seahakkliha 15 ml tsentrifuugi tuubi ja lisage 50 mM Na-atsetaat puhvrit 13 ml mõõduni. Loksutage suspensioon korralikult segi. **Igaüks pipeteerib** 1 ml sellest suspensiooni 1,5 ml tuubi ja tsentrifuugige lauatsentrifuugis 13 000 rpm 2 min. 0,5 ml supernatanti pipeteeri uude 1,5 ml tuubi – **seda kasutate järgnevates katsetes.**

### 2. Peroksüdaasi aktiivsuse määramine bioloogilistest preparaatidest

Igast ekstraktist peate te mõõtma selles sisalduva ensüümi peroksüdaas aktiivsuse – kui mitme mooli produkti teket ajaühikus (näit. 1 min) peroksüdaas katalüüsib. Selleks jälgite te orgaanilise ühendi guaiakooli (2-metoksüfenool) oksüdeerimist vesinikperoksiidi  $H_2O_2$  poolt – peroksüdaas katalüüsib seda reaktsiooni. Guaiakooli oksüdeerimise tulemusena tekkiva värvilise ühendi **DMFK** (3,3'-dimetoksü-4,4'-bifenüülkinoon) kontsentratsiooni on võimalik mõõta spektrofotomeetriliselt 470 nm lainepikkuse juures. Kontrollkatses kasutate te ekstrakti asemel 50 mM Na-atsetaat puhvrit.

1. Valmistage 15 ml "guaiakooli reagenti" :

(4 punkti)

Reagent	Kogus (ml)	Lõppkontsentratsioon
Guaiakool (90 mM)		9 mM
$H_2O_2$ (100 mM)		10 mM
Na-atsetaat (500 mM)		50 mM
Dest. $H_2O$		55 M
kokku	15 ml	

2. Nelja eraldi mikrotsentrifuugi tuubi pipeteerige 100  $\mu$ l vastavat ekstrakti. Viieks tuubi pipeteerige samasugune kogus 50 mM Na-atsetaat puhvrit.
3. Lisage kõigile viiele proovile 900  $\mu$ l "guaiakooli reagenti" ja hoidke proove 10 min toatemperatuuril

4. Mõõtke proovidest optiline tihedus 470 nm lainepikkuse juures ( $OD_{470}$ ) ja kandke  $OD_{470}$  väärtused alljärgnevasse tabelisse. **NB! Kõige tumedama värvusega proovist tehke enne mõõtmist 10 x lahjendus ruumalaga 1 ml 50 mM Na-atsetaat puhvrise.** Mõõtmiseks kasutage ühte ja sedasama spektrofotomeetri küveti.

**Tabel 1**

	$OD_{470}$	$dOD_{470}$ ( $OD_{\text{Proov}} - OD_{\text{Kontroll}}$ )
<b>Kontroll</b>		
<b>Redis</b>		
<b>Porgand</b>		
<b>Õun</b>		
<b>Sealiha</b>		

5. Valmistage 1 ml **20 x lahjendust** 10 mM DMFK-st ja mõõtke lahjenduse  $OD_{470}$  :

$$OD_{470} =$$

6. Arvutage saadud tulemuse põhjal DMFK kontsentratsioon oma proovides ja DMFK moodustumise keskmine kiirus = peroksüdaasi keskmine aktiivsus (mM/min):

**Tabel 2****(4 punkti)**

	$dOD_{470}$	DMFK (mM)	Aktiivsus (mM/min)
<b>Redis</b>			
<b>Porgand</b>			
<b>Õun</b>			
<b>Sealiha</b>			

### **3.Valgusisalduse määramine ekstraktidest**

1. Valmistage seerumi albumiini alglahusest (BSA) 6 erineva kontsentratsiooniga lahust ruumalaga 100 µl 50 mM Na-atsetaat puhvrise :

(3 punkti)

<b>BSA (mg/ml)</b>	<b>BSA alglahus (µl)</b>	<b>Puhver (µl)</b>
0,00		
0,10		
0,20		
0,30		
0,40		
0,50		

2. Eraldi mikrotsentrifuugi tuubidesse pipeteerige 100 µl vastavat **taimset** ekstrakti. **Sealiha** ekstraktist tehke eelnevalt 10 x lahjendus ruumalaga 100 µl
3. Ekstraktidele ja BSA lahustele lisage 900 µl Bradfordi reagenti ning hoidke proove 5 min toatemperatuuril
4. Mõõtke kõigist proovidest optiline tihedus 600 nm lainepikkuse juures ja kandke saadud OD<sub>600</sub> väärtused tabelisse 3. NB! Kõigepealt mõõtke OD<sub>600</sub> albumiini (BSA) standardlahuste jaoks. Seejärel mõõtke optiline tihedus ekstraktide proovidest.

**Tabel 3 :**

<b>BSA (mg/ml)</b>	<b>OD<sub>600</sub></b>	<b>dOD<sub>600</sub></b>
0,00		
0,10		
0,20		
0,30		
0,40		
0,50		
<b>Ekstrakt</b>		
Redis		
Porgand		
Õun		
Sealiha (10 x lahj.)		

5. Arvutage valgu kontsentratsioon (mg/ml) uuritavates ekstraktides, kasutades BSA standardlahuste andmeid. Selleks joonistage kõigepealt ruudulisele lehele graafik, kus x-teljel on BSA kontsentratsioon mg/ml, y-teljel aga OD<sub>600</sub>. Läbi punktide joonistage seejärel silma järgi ja joonlauda kasutades sirge ja arvutage sirge tõus.

Tõus : ..... (ühikud: .....) **(5 punkti)**

Sirge tõusu väärtust ja oma analüüsitavate proovide OD<sub>600</sub>-t teades arvutage valgu kontsentratsioonid ekstraktides. Kontsentratsioonide väärtused kandke järgnevasse tabelisse :

**Tabel 4 :**

**(4 punkti)**

<b>Ekstrakt</b>	<b>Kontsentratsioon (mg/ml)</b>
Redis	
Porgand	
Õun	
Sealiha	

#### **4. Peroksüdaasi eriaktiivsuse arvutamine**

Lisaks ensüümi aktiivsusele on väga oluline ensüümi preparatsiooni iseloomustav suurus preparatsiooni ERIAKTIIVSUS. Eriaktiivsus näitab ensüümi preparatsiooni aktiivsust ensüümi ühikulise hulga kohta. Näiteks aktiivsust mg või mmol ensüümi preparatsiooni kohta. Eriaktiivsus sõltub ensüümi preparatsiooni puhtusastmest, s.t. sellest, kui palju preparatsioonis on lisaks meid huvitavale ensüümile ka teisi valke. Eriaktiivsuse arvutamiseks on vaja teada i) ensüümi aktiivsust ja ii) valgu kogust preparatsioonis. Käesolevas töös olete mõõtnud mõlemat (vt. Tabel 2 ja 4). Nüüd peategi arvutama erinevatest bioloogilistest allikatest pärit peroksüdaasipreparatsioonide eriaktiivsuse. Kõigis neljas ekstraktis sisalduva peroksüdaasi eriaktiivsus väljendage ühikutes : mmol/L DMFK/min\*mg (valk). Arvutamisel lähtuge tabelites 2 ja 4 olevatest andmetest ja arvestage, et igat ekstrakti oli teie katses 100 µl = 0,1 ml.

**(4 punkti)**

<b>Ekstrakt</b>	<b>Eriaktiivsus : mmol/L DMFK/min*mg(valk)</b>
Redis	
Porgand	
Õun	
Sealiha	



**Täiendavaid küsimusi :**

1. Miks kasutasite peroksüdaasi aktiivsuse määramiseks valmistatud proovides puhverlahust ja mitte destilleeritud vett ? **(4 punkti)**
  
2. Miks kasutasite peroksüdaasi aktiivsuse määramise katses (töö nr. 2) lisaks neljale proovile (ekstraktid) veel viendat proovi, kus ekstrakti asemel oli puhver ? **(4 punkti)**
  
3. Miks võiks rakule vajalik olla vabaneda ainevahetuse käigus tekkivast vesinikperoksiidist **(4 punkti)**
  
4. Oletagem, et suutsime töös kasutatud redise ekstrakti kromatograferimise teel suurendada peroksüdaasi sisaldust ekstrakti valkude kogumassist 10 % -lt 30 % -ni. Seejuures oli peroksüdaasi aktiivsus kromatograafia järel saadud preparatsioonis 10 % kõrgem kui ekstrakti peroksüdaasi aktiivsus – valkude kogus oli mõlemal juhul sama. Kas peroksüdaasi preparatsiooni eriaktiivsus kromatograferimise järel kasvas või kahanes (tehke rist teie arust õige vastuse järele):

Kasvanud :

Kahanenud :

**(4 punkti)**