

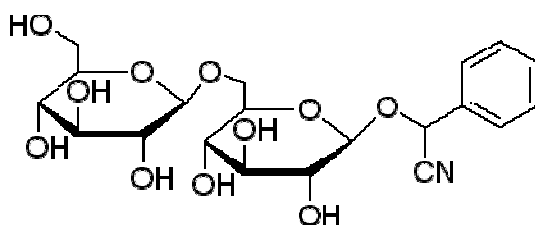
IPARI KINYERÉSTECHNIKA GYAKORLAT BIOMÉRNÖK MSc

IV. BÉTA-GLÜKOZIDÁZ ENZIM TISZTÍTÁSA VIZES KÉTFÁZISÚ EXTRAKCIÓVAL

DE TTK BIOMÉRNÖKI TANSZÉK, Kémia épület D6
Gyakorlatvezető: Molnár Ákos Péter

1. BÉTA-GLÜKOZIDÁZ ENZIM

Az emulzin β -D-glükózidáz (β -D-glükózid glükohidroláz, EC 3.2.1.21) édes mandulában található meg, természetes szubsztrátja az amigdalinnól (1. ábra) keletkező cianogén β -monoglükózid, prunasin (benzaldehyd ciánhidrin β -D-glükózid), amelyet az enzim a glükózidos kötésnél hasít el.



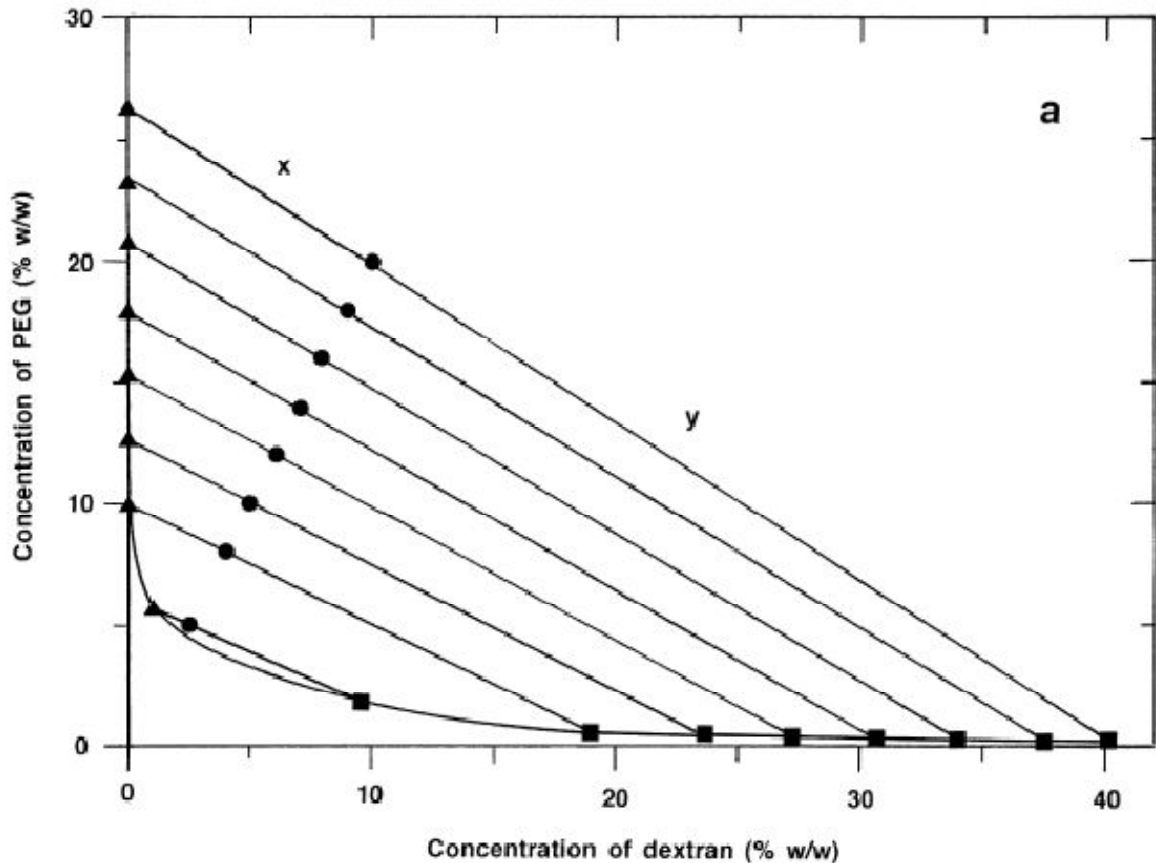
1. ábra Amigdalinn képlete

Az ily módon szabaddá vált aglikon részből az β -hidroxinitril-liáz benzaldehydet és HCN-t szabadít fel. A folyamatban résztvevő enzimek és a szubsztrát az intakt növényi szövetekben külön kompartmentben helyezkedik el, így HCN felszabadulás csak a szövetek mechanikai sérülése - pl. a növény fogyasztása - következtében jelentkezik. A folyamatnak, és így a vizsgálat tárgyát képező enzimnek is a növényevők elleni védekezésben van jelentős szerepe. Az emulzin β -glükózidáz széles szubsztrátspecifitást mutató enzim, azaz természetes cianogén szubsztrátja mellett hidrolizálja a szintetikus *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozidot (PNP- β -Glc) is. Korábbi vizsgálatok szerint a katalitikus nukleofil csoport egy glutamát-karboxilát, míg a proton donor egy aszpartát karboxil csoportja. A β -glükózidázok általános hasítási mechanizmusában résztvevő két ionizálódó aminosav oldallánc közül az egyiknek deprotonálódnia kell, míg a másikkal protonált állapotban kell maradnia az enzim aktivitásához. Ennek megfelelően az enzim aktivitásmérését 5,2 pH-n pufferben végezzük, a reakció leállítására pH=10,0 borát puffert használunk. A reakcióban felszabaduló PNP sárga színű, intenzitása a fenolát anionnak köszönhetően lúgos közegben nagyobb. Mérését 400 nm hullámhosszon spektrofotometriásan végezzük.

2. VIZES KÉTFÁZISÚ EXTRAKCIÓ

A vizes kétfázisú extrakció lehetőséget biztosít fehérjék koncentrálására, kinyerésére, tisztítására fehérje elegyekből, akár fermentlevelekből is. A módszer alapja az, hogy hidrofíll polimereket tartalmazó vizes oldatok két fázisra válnak, mivel a két polimert tartalmazó oldatfázisnak eltérő a polaritása és a sűrűsége. A fehérjék megoszlását a két fázis között sok

paraméter befolyásolja, pl. a fehérje és a polimerek molekulatömege, a fehérje töltésállapota, a közeg pH-ja és ionerőssége. A kis molekulák gyakran azonos koncentrációban vannak a két fázisban. A módszert széles körben alkalmazzák vírusok és fehérjék koncentrálására. A koncentráló folyamat egyszerű, gyors, olcsó és könnyen méret növelhető. A két fázis kialakítására leggyakrabban dextrans-PEG illetve PEG-só oldatokat alkalmaznak. A gyakorlaton dextrans-PEG rendszert alkalmazunk az enzim koncentrálására, a felső fázis főként PEG-et tartalmaz, az alsó dextrans-t. A rendszert leíró fázisdiagram a 2. ábrán látható.



2. ábra PEG 8000-Dextrán 500 rendszer fázisdiagramja

3. GYAKORLAT

3.1. Vizes kétfázisú extrakció kivitelezése

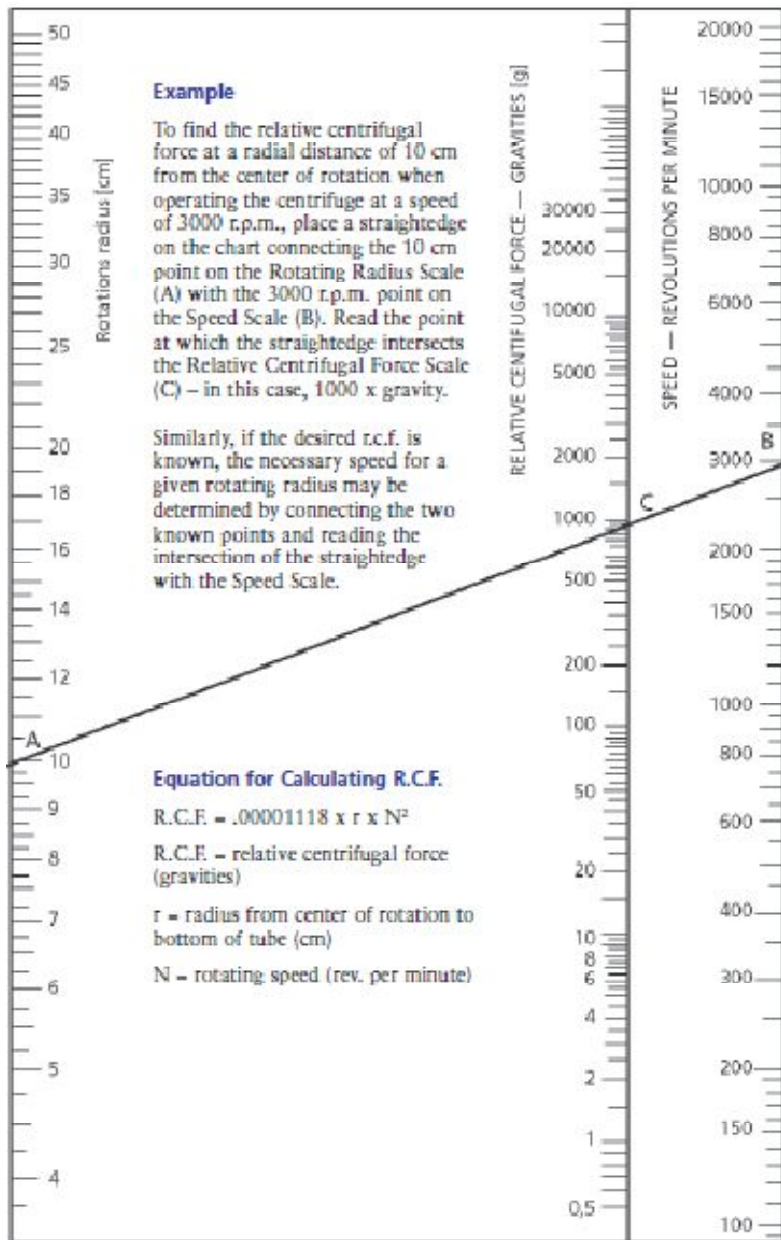
Eszközök: centrifugacső, kémcsőállvány
automata pipetták
centrifuga

Anyagok: "E" puffer: 50 mM KSCN, 1 mM NaPO₄, pH= 8,5
Emulzin béta-glükózidáz (6U/mg): 5,54 mg 50 ml pufferben

Feladat:

1. Mérjük be centrifugacsőbe 0,15 g Dextrans 500-at (3%)

2. Oldjuk fel a dextransz 5 ml enzim oldattal, óvatos kevergetéssel.
3. Másik centrifugacsőbe mérjük be 0,8 g PEG 8000-t.
4. Az enzimet tartalmazó dextransz oldatot öntsük át a szilárd PEG-et tartalmazó csőbe, oldjuk fel a PEG-et is (16%)
5. Rázzuk össze az oldatot alaposan, majd centrifugáljuk 1000 g gyorsulással 10 percig. A fordulatszám kiszámításához használjuk a nomográfot (3. ábra) és a centrifuga rotor adatait.
6. A centrifugálás után Pasteur pipettával óvatosan szívjuk le a felső fázist egy harmadik centrifugacsőbe.
7. Mérjük meg az enzim oldatok aktivitását, használjunk 20 μ l enzim oldatot az aktivitásméréshez a kiindulási enzim oldatból (E_0), az alsó fázisból (E_{1a}) és a felső fázisból (E_{1f}).
8. Extraháljuk a felső fázist újabb alsó fázissal, amit úgy állítunk elő, mint az első extrakciónál (1-6 pont) azzal a különbséggel, hogy az oldást puffer oldattal végezzük. Alapos összerázás után centrifugáljuk az 5. pont szerint.
9. Mérjük a második extrakció alsó (E_{2a}) és felső (E_{2f}) fázisának enzim aktivitását.



3. ábra Nomográf centrifuga gyorsulások és fordulatszámok átszámításához

3.2. *p*-Nitrofenolát kalibrációs egyenes felvétele

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
automata pipetták

Anyagok: "A" puffer: 0.15 M citromsav-Na₂HPO₄, pH=5.2 puffer,
3 mM NaN₃.
"B" puffer: 0.2 M bórsav-NaOH, pH=10.0 puffer.
p-Nitrofenol (PNP) 10⁻⁴ M oldat

Feladat:

Készítsünk az "A" és "B" puffer 1:2 arányú elegyében 0.1 mM *p*-nitrofenolát törzsoldatot. Az oldat intenzív sárga színe a *p*-nitrofenolát anionra jellemző. Ezután mérjük össze a következő kalibrációs sorozatot:

	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
PNP oldat (ml)	0.	0.1	0.2	0.3	0.4	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9 1.0
A+B 1:2 pufferelegy (ml)	3	2.9	2.8	2.7	2.6	2.5	2.4	2.4	2.3	2.2	2.1

Az oldatokat A:B, 1:2 arányú puffereleggyel szemben $\lambda=400$ nm-nél fotometráljuk, és az abszorbancia értékeket ábrázoljuk a PNP ionok nmol-ban (és nem nM-ban!) kifejezett mennyiségének függvényében. Az aktivitás mérések során ezt a kalibrációs görbét használjuk.

3.3. Extrahált enzimoldatok aktivitásának meghatározása

Eszközök: kémcső, kémcsőállvány
stopper óra
automata pipetták
37 °C-os vízfürdő

Anyagok: "A" puffer
"B" puffer
emulzin β -glükozidáz-oldat (enzim-oldat)
Szubsztrát oldat: 5 mM PNP- β -Glc "A" pufferben feloldva

Feladat:

Az aktivitás méréshez mérjük számozott kémcsövekbe 20 ill. 40 μ l enzimoldatot és 880 ill. 860 μ l A puffert. Az oldatokat helyezzük 37 °C-os vízfürdőbe, majd 5 perc előinkubálás után a reakciókat 100 μ l szubsztrátoldat-részletekkel egymást 30 másodperces időtartamokkal követően indítjuk el. Az 5 perces reakcióidő letelte után a reakciókat 2 ml "B" puffer

hozzáadásával állítsuk le (az elindításakor alkalmazott időtartamokkal egymást követően). Az oldatokat "A"+"B", 1:2 puffereleggyel szemben 400 nm-nél fotometráljuk. A kalibrációs görbe felhasználásával állapítsuk meg a felszabadult *p*-nitrofenolát mennyiségét, és számítsuk ki a reakciósebességeket nmol/perc egységekben.

	1.	2.	3.	4.	5.
A					
v (nmol/perc)					

Válaszoljon a következő kérdésekre:

1. Milyen a fázisarány a gyakorlaton alkalmazott PEG-Dextrán rendszerben?
2. Hogyan tudná megfordítani a fázisarányt?
3. Melyik fázisban dúsul fel a béta-glükozidáz enzim?
4. Van-e szükség további extrakcióra?
5. Az alsó, vagy a felső fázist extrahálná tovább?