

Uporaba encimov

Navodila za vaje

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za biokemijo
Študijsko leto 2013/2014*

dr. Marko Novinec

dr. Miha Pavšič

Mateja Presečnik, univ. dipl. inž. živ. tehnol.

1. vaja - Imobilizacija tripsina	3
Del A - Imobilizacija tripsina na sefarozo	3
Del B - Imobilizacija tripsina v alginatu	4
2. in 3. vaja - Merjenje aktivnosti imobiliziranega encima	7
Del A - Merjenje aktivnosti s sintetičnim substratom BAPNA	7
Del B - Termična stabilnost imobiliziranega tripsina	8
Del C - Aktivnost imobiliziranega tripsina na makromolekulskem substratu	8
4. vaja - Encimi v pralnih praških	10
Del A - Prisotnost proteaz v pralnih praških	10
Del B - Učinkovitost pralnih praškov pri odstranjevanju proteinskega madeža	11
5. vaja - Izdelava sira	13
Postopek za kislinsko koagulacijo	13
6. vaja - Določevanje glukoze v hrani	14

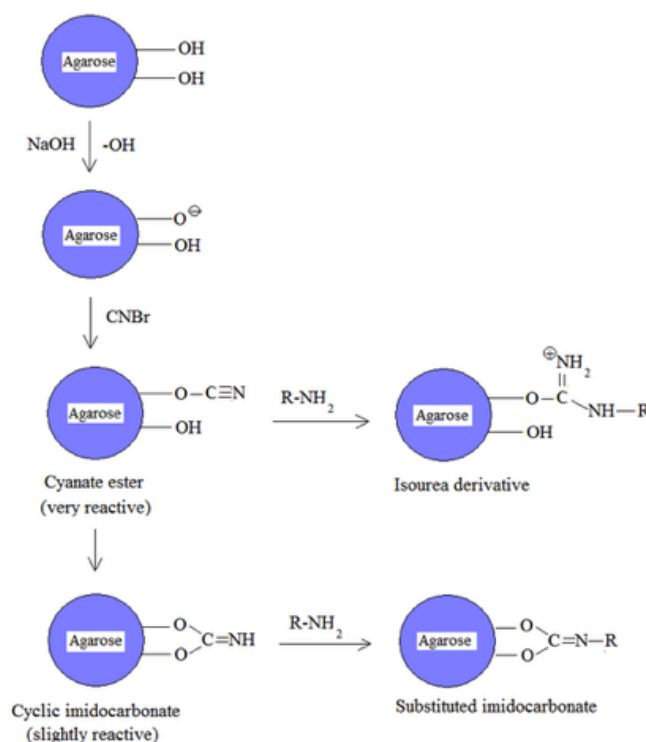
1. vaja - Imobilizacija tripsina

Pri tej vaji boste spoznali dva načina imobilizacije encimov, in sicer imobilizacijo na površino agaroznih delcev ter imobilizacijo v alginatni gel. V obeh primerih boste izmerili aktivnost imobiliziranega encima in jo primerjali z aktivnostjo prostega encima.

Encim, ki ga boste imobilizirali, je serinska peptidaza tripsin (EC 3.4.21.4). Aktivno mesto tripsina vsebuje značilno katalitično triado Ser-His-Asp, encim pa kaže preferenco za Lys in Arg ostankov na poziciji P1, torej neposredno pred mestom cepitve.

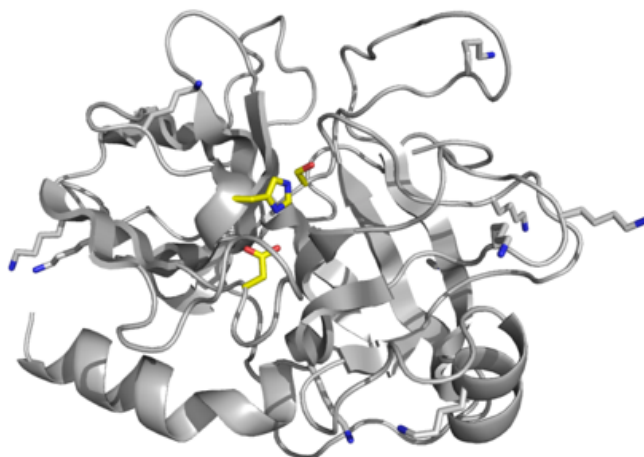
Del A - Imobilizacija tripsina na sefarozo

Sefaroza je komercialno ime za gosto zamrežen agarozni gel v obliki kroglic in je eden najpopularnejših nosilcev v biokemiji. Za imobilizacijo proteinov in drugih ligandov se uporablja sefaroza, na katero so vezane različne reaktivne skupine. Na vajah boste uporabljali s cianogen bromidom aktivirano sefarozo, pri kateri je na agarozne kroglice kovalentno vezana reaktivna cianatna skupina, ki preferenčno reagira s primarnimi aminskimi skupinami, torej s stranskimi verigami Lys ostankov v proteinih (ter seveda N-koncem). Potek aktivacije sefaroznega nosilca in vezave liganda je shematsko prikazan na sliki 1.



Slika 1.1: aktivacija agaroznega nosilca s cianogen bromidom in vezava liganda.

V molekuli tripsina je deset Lys ostankov, preko katerih se encim lahko veže na nosilec (slika 2). Od tega, kateri Lys bo dejansko reagiral z nosilcem, je odvisna orientacija molekule na nosilcu. Če vezava poteče preko Lys ostanka, ki je v bližini aktivnega mesta, lahko taka vezava sterično oteži vezavo substrata v aktivno mesto encima. Taka molekula bo imela nižjo aktivnost od molekule, vezane v bolj »ugodni« orientaciji.



Slika 1.2: Tridimenzionalna struktura prašičjega tripsina. Katalitska triada je prikazana kot rumene paličice. Lys ostanki so prikazani kot sive paličice. Slika je bila narejena s programom PyMOL.

Material

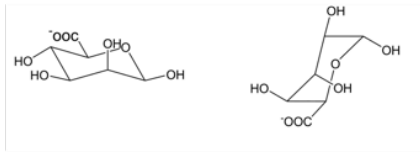
- Suspenzija s CNBr aktivirane sefaroze v 1 mM HCl
- Vezavni pufer – 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3 z 0,5 M NaCl
- Pufer za blokado – 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 z 0,5 M NaCl
- Pufer za spiranje – 0,1 M NaOAc pH 4,0 z 0,5 M NaCl
- Tripsin iz prašičjega pankreasa v kristalinični obliki

Postopek dela

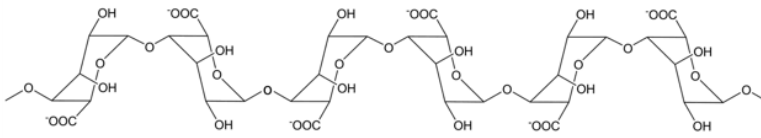
1. Suspenzijo sefarnega gela (~ 2 ml) posedite s centrifugiranjem (1000 × g, 1 min) in previdno odstranite supernatant.
2. Gel sperite s približno 10 ml vezavnega pufru, ga odcentrifugirajte in odstranite supernatant.
3. V ustreznem volumnu (~ 1 ml) vezavnega pufru raztopite približno 10 mg tripsina in raztopljen encim dodajte v centrifugirko z gelom.
4. Inkubirajte 1 do 2 uri na sobni temperaturi ob rahlem mešanju.
5. Gel posedite s centrifugiranjem in odstranite supernatant.
6. Dodajte približno 10 ml blokirnega pufru in inkubirajte preko noči pri 4°C.
7. Gel sperite s pufram za spiranje in nato z vezavnim pufram. Postopek ponovite 3-krat.
8. Na koncu gel resuspendirajte v enem volumnu reakcijskega pufru, tako da dobite 50% suspenzijo gela. Tripsin-sefarozo shranite pri 4°C.

Del B - Imobilizacija tripsina v alginatu

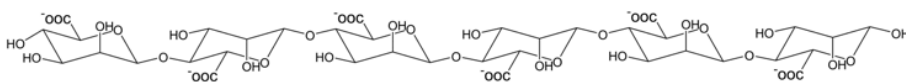
Alginat je linearni polisaharid, ki ga proizvajajo nekatere vrste alg. Je kopolimer dveh različnih monosaharidov, β-D-manuronske kisline (v konformaciji ⁴C₁) (M) in α-L-guluronske kisline (v konformaciji ¹C₄) (L), med seboj povezanih z (1,4) glikozidnimi vezmi (slika 1.3A). V polisaharidni verigi se ponavadi izmenjujejo regije poli-M ostankov, poli-G ostankov ter mešane regije M-G-M-G, ki vsaka tvorijo nekoliko drugačno tridimenzionalno strukturo (slika 1.3B). Alginati so topni v čisti vodi ter v raztopinah, ki vsebujejo monovalentne katione, v prisotnosti divalentnih kationov (z izjemo magnezija) pa spontano tvorijo goste gele. To lastnost lahko izkoristimo za imobilizacijo bioloških makromolekul, zaradi blagih pogojev gelatinizacije pa lahko v alginatu imobiliziramo tudi žive celice. Gel nastane, ker dve sosednji verigi alginata tvorita koordinativno vez z istim kationom, zaradi česar se struktura polimerov v raztopini uredi. Koordinacija poteka preko karboksilnih in hidroksilnih skupin, najmočnejše katione vežejo poli-G regije na način prikazan na sliki 1.4. Posledica tega je, da je trdnost gela odvisna od deleža G ostankov v polimeru.

A β -D-manuronska kislina α -L-guronska kislina**B**

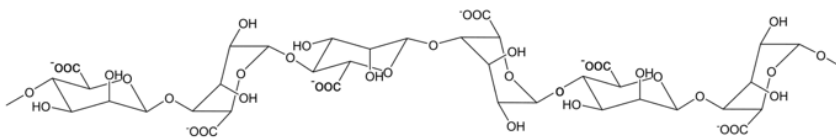
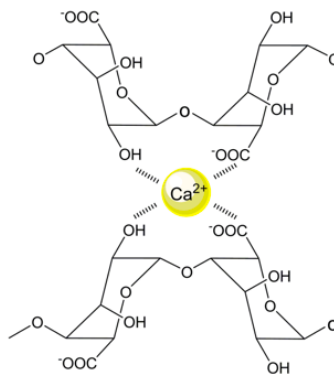
polimer guluronata (poli-G)



polimer manuronata (poli M)



kopolimer manuronata in guluronata (M-G-M-G-M-G)

**Slika 1.3:** (A) Struktura osnovnih enot alginata. (B) Strukture različnih regij znotraj verige alginata.**Slika 1.4:** Koordinacija kalcija na karboksilne in hidroksilne skupine poli-G regij alginata.

Alginatni geli ostanejo v trdni obliki tudi pri povišanih temperaturah (do 100°C), raztopimo pa jih lahko z inkubacijo v raztopini monovalentnih kationov (ali magnezijevih ionov), ki zamenjajo kalcijeve ione ali pa kelatorjev divalentnih ionov (npr. EDTA). Zaradi teh lastnosti moramo biti pri delu z alginatnimi geli previdni pri izbiri pufrov. Ne smemo uporabljati pufrov z visoko koncentracijo natrijevih ali kalijevih ionov, prav tako pa ne smemo uporabljati pufrov, ki interagirajo s kalcijevimi ioni (npr. citratnih ali fosfatnih pufrov).

Material

- natrijeva sol alginske kisline
- tripsin iz prašičjega pankreasa v kristalinični obliki
- raztopina 0,2 M CaCl₂
- reakcijski pufer – 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 s 3 mM CaCl₂

Postopek dela

1. Pripravite 3 ml 3% (w/v) raztopino alginata v vodi. Alginat se najhitreje raztopi tako, da prah med mešanjem postopoma dodajate v čašo z vodo.
2. V približno 3 ml gela raztopite 3 do 5 mg tripsina.
3. Raztopino po kapljicah dodajate v čašo z 200 ml 0,2 M CaCl₂, ki se meša na magnetnem mešalu.
4. Raztopino mešajte še okoli 30 min, da se kroglice gela popolnoma strdijo.
5. Zberite kroglice in jih shranite v reakcijskem pufru v mikrocentrifugirki.

2. in 3. vaja - Merjenje aktivnosti imobiliziranega encima

Namen tega sklopa vaj je okarakterizirati aktivnost imobiliziranega tripsina ter jo primerjati z aktivnostjo nemodificiranega tripsina. V ta namen bomo uporabili dva različna substrata, in sicer sintetični substrat BAPNA (N- α -benzoil-arginil-paranitroanilid) ter makromolekulski substrat azokazein, tj. mlečni protein kazein, konjugiran z azo-barvilom. Pri interpretaciji rezultatov se bomo osredotočili na različne parametre, kot so kinetične lastnosti, stabilnost encima ter dostopnost substrata do encima. Upoštevati je potrebno tudi različne koncentracije encima, ki utegnejo biti prisotne pri različnih meritvah ter rezultate ustrezno normalizirati. V primeru tripsin-sefaroze boste izhajali iz 50% suspenzije gela, za katero lahko predpostavite, da je homogena, če jo pred uporabo dobro premešate. V primeru kroglic alginata pa boste normalizacijo izvedli tako, da boste vsako kroglico pred uporabo stehali in rezultate normalizirali na enoto mase kroglice.

Del A - Merjenje aktivnosti s sintetičnim substratom BAPNA

Material

- reakcijski pufer – 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 s 3 mM CaCl₂
- substrat BAPNA – 54 mM v DMSO
- 0,2 M HCl
- raztopina tripsina s koncentracijo 1 mg/ml
- tripsin-sefaroza – 50% suspenzija
- kroglice tripsin-alginata

Postopek dela za nemodificiran tripsin

1. Pripravite 8 mikrocentrifugirk, ki vsebujejo različne koncentracije substrata (končne koncentracije 100 μ M do 1500 μ M) v reakcijskem pufru, tako da bo končni volumen reakcijske mešanice po dodatku encima 1 ml.
2. V vsako mikrocentrifugirko dodajte 20 μ l raztopine tripsina ter vzorce inkubirajte 10 min na 37 °C.
3. Prekinite reakcije z dodatkom 500 μ l 0,2 M HCl.
4. Izmerite absorbanco vzorcev pri 410 nm (A_{410}) in narišite diagram odvisnosti A_{410} (ki je sorazmerna hitrosti reakcije) od koncentracije substrata.

Postopek dela za tripsin-sefarozo

1. Pripravite 8 mikrocentrifugirk, ki vsebujejo različne koncentracije substrata (končne koncentracije 100 μ M do 1500 μ M) v reakcijskem pufru, tako da bo končni volumen reakcijske mešanice po dodatku encima 1 ml.
2. V vsako mikrocentrifugirko dodajte 20 μ l suspenzije tripsin-sefaroze ter vzorce inkubirajte 10 min na 37°C.
3. Prekinite reakcije z dodatkom 500 μ l 0,2 M HCl.
4. Izmerite A_{410} vzorcev in narišite diagram odvisnosti A_{410} od koncentracije substrata.

Postopek dela za tripsin-alginat

1. Stehtajte 8 mikrocentrifugirk.
2. V vsako mikrocentrifugirko prenesite po eno kroglico tripsin-alginata, jih ponovno stehtajte in izračunajte maso kroglice.
3. V vsako mikrocentrifugirko dodajte reakcijski pufer in toliko substrata, da boste dobili serijo različnih koncentracij substrata (končne koncentracije 100 μ M do 1500 μ M). Končni volumen naj bo 1 ml, pri čemer volumen kroglice zanemarite.
4. Vzorce inkubirajte 10 min na 37°C.
5. Prekinite reakcije z dodatkom 500 μ l 0,2 M HCl ali pa prenesite supernatant v nove mikrocentrifugirke.
6. Izmerite A_{410} vzorcev in narišite diagram odvisnosti A_{410} od koncentracije substrata.

Del B - Termična stabilnost imobiliziranega tripsina

Material

- reakcijski pufer – 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 s 3 mM CaCl₂
- substrat BAPNA – 54 mM v DMSO
- 0,2 M HCl
- raztopina tripsina s koncentracijo 1 mg/ml
- tripsin-sefaroza – 50% suspenzija
- kroglice tripsin-alginata

Postopek dela za nemodificiran tripsin

1. Pripravite 7 mikrocentrifugirk, ki vsebujejo 20 µl raztopine tripsina v 1 ml reakcijskega pufera.
2. Mikrocentrifugirke inkubirajte na 60°C.
3. Po časih 0, 10, 20, 30, 40, 50 in 60 min vzemite po eno mikrocentrifugirko in jo prestavite na led.
4. Po končani inkubaciji vsem alikvotom izmerite preostalo encimsko aktivnost po protokolu prejšnjega poskusa. Končna koncentracija substrata naj bo 1 mM v vseh alikvotih.
5. Narišite diagram odvisnosti preostale encimske aktivnosti od časa inkubacije na 37°C.

Postopek dela za tripsin-sefarozo

1. Pripravite 7 mikrocentrifugirk, ki vsebujejo 20 µl suspenzije tripsin-sefaroze v 1 ml reakcijskega pufera.
2. Mikrocentrifugirke inkubirajte na 60°C.
3. Po časih 0, 10, 20, 30, 40, 50 in 60 min vzemite po eno mikrocentrifugirko in jo prestavite na led.
4. Po končani inkubaciji vsem alikvotom izmerite preostalo encimsko aktivnost po protokolu prejšnjega poskusa. Končna koncentracija substrata naj bo 1 mM v vseh alikvotih.
5. Narišite diagram odvisnosti preostale encimske aktivnosti od časa inkubacije na 37°C.

Postopek dela za tripsin-alginat

1. Stehtajte 8 mikrocentrifugirk.
2. V vsako mikrocentrifugirko prenesite po eno kroglico tripsin-alginata, jih ponovno stehtajte in izračunajte maso kroglice.
3. V vsako mikrocentrifugirko dodajte 1 ml reakcijskega pufera.
4. Mikrocentrifugirke inkubirajte na 60°C.
5. Po časih 0, 10, 20, 30, 40, 50 in 60 min vzemite po eno mikrocentrifugirko in jo prestavite na led.
6. Po končani inkubaciji vsem alikvotom izmerite preostalo encimsko aktivnost po protokolu prejšnjega poskusa. Končna koncentracija substrata naj bo 1 mM v vseh alikvotih.
7. Narišite diagram odvisnosti preostale encimske aktivnosti od časa inkubacije na 37°C.

Del C - Aktivnost imobiliziranega tripsina na makromolekulskem substratu

Material

- reakcijski pufer – 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 s 3 mM CaCl₂
- substrat azokazein – 5 mg/ml v reakcijskem pufru
- 100% (w/v) raztopina TCA (trikloroetanojska kislina)
- 0,5 M NaOH
- raztopina tripsina s koncentracijo 1 mg/ml
- tripsin-sefaroza – 50% suspenzija
- kroglice tripsin-alginata

Postopek dela za nemodificiran tripsin

1. V mikrocentrifugirko odpipetirajte 1500 µl raztopine azokazeina in dodajte 20 µl raztopine tripsina.
2. Mikrocentrifugirko inkubirajte na 37°C.
3. Po časih 10, 20, 30, 45, 60, 75 in 90 min odvezemite iz vzorca po 200 µl reakcijske mešanice in jo prenesite v novo mikrocentrifugirko ter oborite proteine z dodatkom 10 µl TCA. Mikrocentrifugirko

shranite na ledu. Na enak način pripravite še slepo probo, ki vsebuje le azokazein in jo boste uporabili za nastavitev bazne linije na spektrofotometru.

4. Vzorce odcentrifugirajte ($14.000 \times g$, 10 min), supernatante prenesite v nove mikrocentrifugirke ter jim dodajte po 800 μ l 0,5 M NaOH.
5. Izmerite absorbanco vzorcev pri 440 nm (A_{440}). Kot ničlo uporabite vzorec azokazeina brez dodanega tripsina.
6. Narišite diagram odvisnosti koncentracije sproščenega azo-barvila od časa.

Postopek dela za tripsin-sefarozo

Postopek za določanje aktivnosti tripsin-sefaroze je identičen protokolu za nemodificiran tripsin, le da namesto raztopine tripsina v vzorec dodate 20 μ l suspenzije tripsin-sefaroze.

Postopek dela za tripsin-alginat

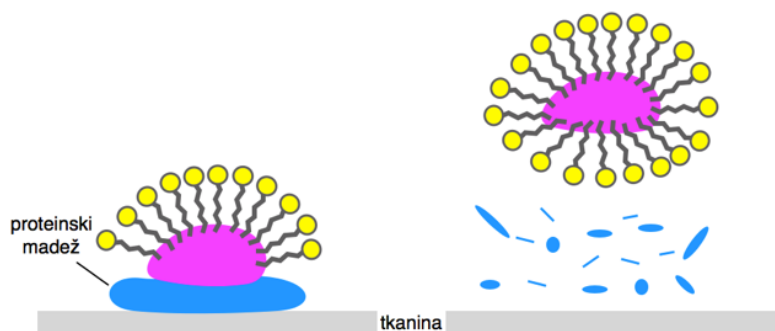
Postopek za določanje aktivnosti tripsin-sefaroze je identičen protokolu za nemodificiran tripsin, le da namesto raztopine tripsina v vzorec dodate kroglico tripsin-alginata.

4. vaja - Encimi v pralnih praških

Moderni pralni praški vsebujejo zraven detergentov (surfaktantov) številne druge komponente: kemična in optična belila, sredstva za mehčanje vode, dišave in encime. Slednji so ključnega pomena za učinkovito odstranjevanje umazanije že pri nizkih temperaturah, hkrati pa za okolje predstavljajo v primerjavi z bolj agresivnimi pralnimi komponentami zelo nizko obremenitev. V pralnih praških tako najdemo:

- proteaze, ki pomagajo pri odstranjevanju proteinskih madežev (madeži krvi, trave, ...),
- lipaze za odstranjevanje maščobnih madežev (olje, maslo, omake, ...),
- amilaze za odstranjevanje madežev, ki temeljijo na škrobu (krompir, testenine, ...) in
- celulaze, ki v osnovi niso namenjene odstranjevanju madežev ampak odstranjujejo razrahljane fibrile celulozih vlaknen v bombažnih tkaninah ter s tem naredijo tkanino mehkejšo, posredno omogočajo drugim pralnim komponentam lažji dostop do ujete umazanije ter preprečujejo pojav sivenja blaga.

Pri vaji se bomo osredotočili na proteaze in odstranjevanje proteinskih madežev. Le-ti so ponavadi relativno močno vezani na vlakna tkanin in pri tem delujejo kot "lepilo", ki celo preprečuje odstranitev druge, sicer lahko odstranljive umazanije. Proteaze v praških razgradijo vezane proteine na topne peptide ali aminokislino in s tem omogočajo njihovo odstranitev s tkanine ob pomoči surfaktantov (slika 5.1)



Slika 4.1: proteinski madež deluje kot lepilo, ki preprečuje odstranitev druge, nanj vezane umazanije (levo), le-ta pa postane po razgraditvi proteinskega dela madeža s proteazami bistveno lažje odstranljiva (desno).

Del A - Prisotnost proteaz v pralnih praških

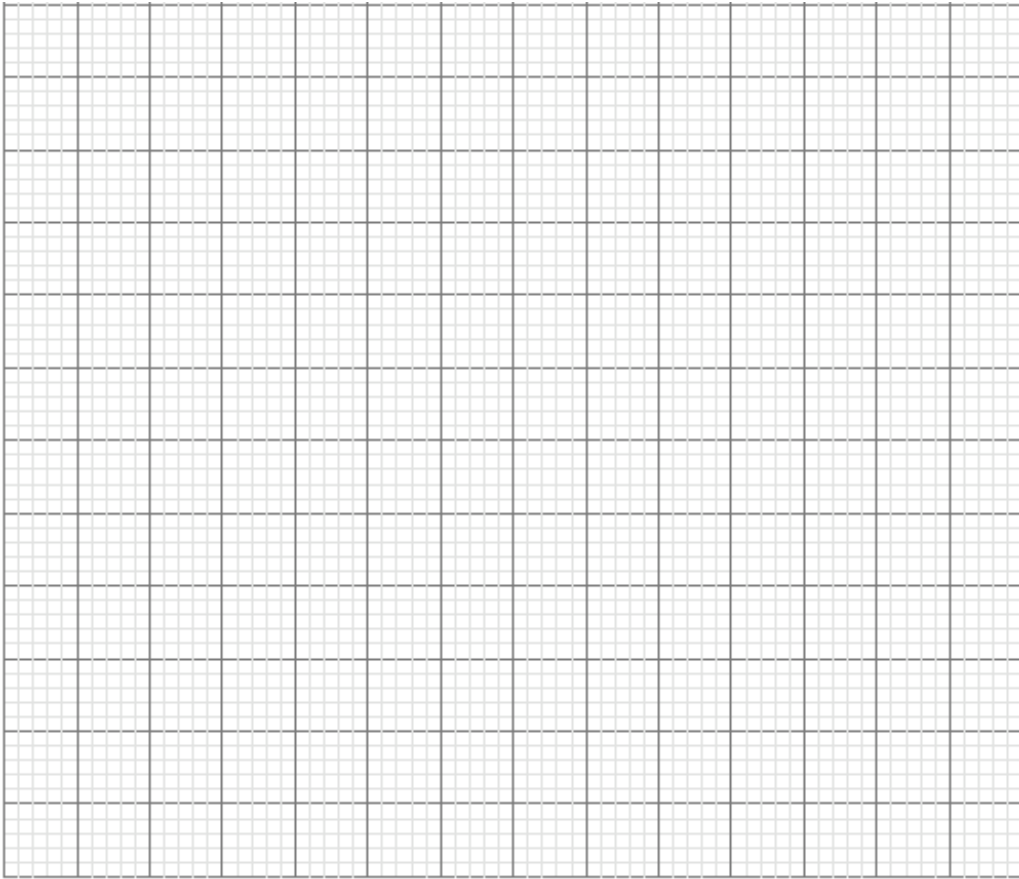
Prisotnost proteaz v pralnih praških lahko dokažemo zelo enostavno - s testom razgradnje želatine. Želatina je pravzaprav hidrolizirana oblika kolagena, izoliranega iz živalske kože in kosti. Za primerjavo izvedemo tudi eksperiment, kje kot substrat uporabimo agar, ki je za razliko od želatine polisaharid.

Material

- Pralni prašek v tekoči ali trdni obliki (vsak par naj na vajo prinese majhno količino praška)
- Ne-encimsko čistilo (milo za roke)
- Želatinozne plošče (5% želatina, skuhana v vodi, in strjena v hladilniku)
- Agarne plošče (2% agar, raztopljen v vodi s kuhanjem)

Izvedba vaje

1. Na želatinozni plošči na hrbtni strani označite dele, kamor boste nanесли različne detergente. Enako naredite tudi za agarno ploščo.
2. Na označene regije potresite oz. nakaplajte malo detergenta za perilo, mila za roke, vode (negativna kontrola), ipd.
3. Pplošče pustite na sobni temperaturi.
4. Ob koncu vaje sperite površino želatine in agarja.
5. Primerjajte delovanje različnih detergentov na želatino. Kaj pa agarna plošča?



5. vaja - Izdelava sira

Mleko je belo-rumena motna tekočina, sestavljena iz vode, proteinov, maščobe in sladkorja. 80% proteinov v kravjem mleku je kazeinov, procent pa precej varira glede na izvor mleka. Kazeini so organizirani v kazeinske micelle, katere držijo skupaj ioni Ca^{2+} in hidrofobne vezi.

Glavne kazeinske frakcije so: α -kazeini, β -kazeini, γ -kazeini in κ -kazeini. κ -kazeinov je okrog 10% in so za koagulacijo mleka najpomembnejši, saj encimi v sirišču razgrajujejo prav ta kazein. κ -kazein je tudi edini izmed kazeinov, ki je topen v prisotnosti ionov Ca^{2+} . Ostale kazeine pred koagulacijo v mleku "rešuje" agregacija s κ -kazeinom v kazeinske micelle. κ -kazein je sestavljen iz dveh delov:

- parakazein - hidrofobni del (to je tisti del, ki bo pozneje tvoril koagulum) in
- glikopeptid - vsebuje sladkorje in njihove derivati, ima hidrofilen značaj (prehaja v sirotko).

Sirišče

Glavni del sirišča je encim renin ali kimozin. V sirišču se ponavadi nahajajo tudi pepsin in nekatere lipaze. Renin lahko pridobimo iz želodcev mlade govedi, kjer je prisoten zato, da koagulira popito mleko in tako omogoči boljši izkoristek snovi iz mleka. Pri ljudeh to delo opravi pepsin. Renin je lahko tudi glivnega (*Aspergillus niger*) oz. kvasnega izvora (*Kluyveromyces lactis*) ali pa je proizvod plesni rodu *Mucor*.

Koagulacija mleka

Bistvo koagulacije je pravzaprav nevtralizacija kazeinske micelle. Izoelektrična točka kazeinske micelle je 4,6, pH mleka pa je 6,6.

Encimska koagulacija

Kazein je v svežem mleku v obliki kazeinskih micel. Vsaka je sestavljena iz večih kazeinov in obdana s hidratnim plaščem. Ko z encimom odcepimo glikopeptid kazeinska micela izgubi svoj hidrofilni del in z njim povezan hidratni plašč → postane netopna in se izloči → nastane koagulum. Parakazein nima več sposobnosti povezati kazeine v micelo in jih obvarovati pred agregacijo v prisotnosti ionov Ca^{2+} . Encim odcepi glikopeptid od parakazeina med Phe105 in Met106 (glede na aminokislinsko zaporedje κ -kazeina).

Kislinska koagulacija

Zaradi dodajanja kisline pH pada do izoelektrične točke kjer kazeinska micela izgubi negativni naboj ter postane nevtralna in netopna – se izloči.

Postopek za kislinsko koagulacijo

1 l mleka zavremo (100°C), lonec odstavimo in mleku dodamo sok ene limone. Pomešamo z vilico in pustimo stati 5-10 minut. Zmes nato precedimo čez kuhinjsko krpo, pri tem pa iztisnemo čim več sirotke. Kuhinjsko krpo razpremo, dodamo ščepec soli in premešamo. Še enkrat dobro stisnemo. Sirno zrno razdrobimo in prenesemo v plastičen lonček. Pritisnemo ob dno in obtežimo ter shranimo v hladilniku.

Postopek za encimsko koagulacijo

1 l mleka segrejemo do 65°C, ga odstavimo in ohladimo na 32°C. Dodamo žlico jogurta in 4 kapljice sirila. Premešamo in pustimo stati vsaj pol ure. Koagulat razrežemo na čim manjše kose in počakamo še 10 minut. Koagulat nato rahlo mešamo (nekaj minut). Zmes precedimo čez kuhinjsko krpo in iz mase stisnemo čim več sirotke. Dodamo ščepec soli in še enkrat stisnemo. Sirno zrno razdrobimo in prenesemo v plastičen lonček. Pritisnemo ob dno in obtežimo ter shranimo v hladilniku.

6. vaja - Določevanje glukoze v hrani

Kvalitativna in kvantitativna analiza je v industriji hrane in pijač izrednega pomena in sicer z vidika kvalitete, shranjevanja, nutricionistike ter varnosti. Količina določenih ogljikovih hidratov, na primer glukoze, laktoze, fruktoze, saharoze in škroba, je še posebej pomembna v primeru alergij ter pri diabetikih. Prav tako lahko prisotnost neželenih sladkorjev ali produktov njihove hidrolize vpliva na proizvodni proces ter zmanjša čas uporabnosti živila, po drugi strani pa lahko predstavlja znake mikrobne kontaminacije ali nepravilne predelave, na primer pretiranega segrevanja. Spremljanje količine sladkorjev v izvornih surovinah je še posebej pomembno v industriji sokov in vin.

Za izvedbo rutinskih postopkov, kot je na primer določanje koncentracije neke snovi v zmesi, so pogosto na voljo kompleti reagentov ("kiti", *angl.* reagent kits). Prednosti njihove uporabe so hitrost, natančnost, ponovljivost, standardiziranost ter pogosto enostavnost. Pri tej vaji boste tako spoznali dva kompleta reagentov za določanje koncentracije glukoze v zmesi. Oba vključujeta encime, katerih substrat je glukoza, s čimer dosežemo visoko specifičnost testa:

- test, ki temelji na encimski fosforilaciji glukoze v zmesi glukoza-6-fosfat ter encimski oksidaciji nastalega produkta, ob čemer nastaja tudi NADH, ki ga lahko enostavno detektiramo spektrofotometrično z merjenjem absorbanca svetlobe z valovno dolžino 340 nm,
- test, ki temelji na encimski oksidaciji glukoze, pri čemer se sprošča vodikov peroksid, le-ta pa nato vstopa v reakcijo oksidacije o-dianizidina v obarvan produkt, ki ga stabiliziramo v kislem in detektiramo spektrofotometrično.

Obema kompletoma reagentov je dodana standardna raztopina glukoze, s katero pripravimo umeritveno premico, iz enačbe katere lahko izračunamo koncentracijo glukoze v vzorcu.

Material

- Komplet reagentov za določanje glukoze z heksokinazo HK (Sigma Aldrich)
- Vzorec, v katerem boste določali koncentracijo glukoze (npr. pijača, ki jo prinesete na vaje)

Izvedba vaje

Sledite navodilom, ki so priložena kompletoma reagentov. Bodite pozorni na opozorila.

Vzorci za merjenje pripravljajte tako, da bo končni volumen posamezne reakcijske mešanice 1 ml, kar zadostuje za merjenje na spektrofotometru v 1 ml-kiveti.



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

Product Information

Glucose (HK) Assay Kit

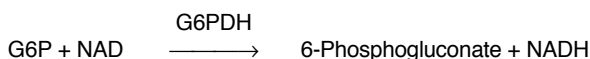
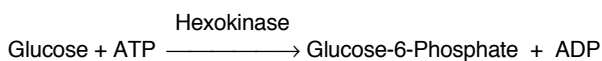
Product Code **GAHK-20**
Storage Temperature 2–8 °C

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

Enzymes, as analytical tools, have found widespread use in the food, biochemical, and pharmaceutical industry. Enzymatic methods are specific, reproducible, sensitive, rapid, and therefore, ideal for analytical purposes. Due to the high specificity and sensitivity of enzymes, quantitative assays may be done on crude materials with little or no sample preparation. This kit is for the quantitative, enzymatic determination of glucose in food and other material.

Principle



Glucose is phosphorylated by adenosine triphosphate (ATP) in the reaction catalyzed by hexokinase. Glucose-6-phosphate (G6P) is then oxidized to 6-phosphogluconate in the presence of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) in a reaction catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). During this oxidation, an equimolar amount of NAD is reduced to NADH. The consequent increase in absorbance at 340 nm is directly proportional to glucose concentration.

Components

1. Glucose (HK) Assay Reagent (Product Code G 3293)
Reconstitute the vial contents with 20 ml of water. After addition of water, stopper the vial and immediately mix several times by inversion. **DO NOT SHAKE.**

Each vial when reconstituted with 20 ml of water contains 1.5 mM NAD, 1.0 mM ATP, 1.0 unit/ml of hexokinase, and 1.0 unit/ml of glucose-6-phosphate dehydrogenase with sodium benzoate and potassium sorbate as preservatives.

The dry reagent is stored at 2-8 °C. The reagent should be discarded if the vial contents exhibit caking due to possible moisture penetration, if the vial contents do not dissolve completely upon reconstitution, or if the reconstituted solution appears turbid.

The reconstituted reagent is stable, in the absence of visible microbial growth for 7 days at 18-26 °C and for at least 4 weeks at 2-8 °C. The reagent is not suitable for use if the absorbance of the freshly reconstituted solution measured at 340 nm versus water as the reference is greater than 0.350.

2. Glucose Standard Solution (Product Code G 3285)
D-Glucose, 1.0 mg/ml in 0.1% benzoic acid. This standard is **traceable to an NIST standard** and is supplied ready-to-use. It is stable at 2-8 °C for at least six months. Discard if turbidity develops.

Equipment Required but Not Provided

1. Spectrophotometer suitable for measuring absorbance at 340 nm.
2. Cuvets
3. Pipettes capable of accurately dispensing 10 µl to 1 ml.

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

Store the kit at 2–8 °C.

Procedure

Sample Preparation:

Liquids - Dilute sample with deionized water to 0.05 - 5 mg of glucose/ml.

Filter or deproteinize solution if necessary to clarify. Solutions that are strongly colored and that have a low glucose concentration should be decolorized. Carbonated or fermented products must be degassed.

Solids - Weigh out sample to nearest 0.1 mg. Extract sample with deionized water. The solution may be heated (<75 °C) to aid extraction. Dilute with deionized water to 0.05 – 5 mg of glucose/ml. Filter or deproteinize solution, if necessary, to clarify.

Determination:

Pipette a volume of solution corresponding to 0.5 - 50 µg of glucose. Repeat assay and vary the sample volume, if necessary, to give an ΔA_{340} between 0.03 and 1.6.

1. Pipette the following solutions into the appropriately marked test tubes.

Tube	Glucose Assay Reagent (ml)	Sample Volume (µl)	Volume of Deionized Water (ml)
Sample Blank	---	Same as for Test	1.0
Reagent Blank	1.0	---	Same as Sample Volume for Test
Test	1.0	10 - 200	---

2. Mix tubes and incubate for 15 minutes at room temperature (18-35 °C).
3. Measure the absorbance at 340 nm versus deionized water.

Calculations:

The total blank must take into account the contribution to the absorbance of the sample and the glucose assay reagent.

$$A_{\text{Total Blank}} = A_{\text{Sample Blank}} + A_{\text{Reagent Blank}}$$

$$\text{mg glucose/ml} = \frac{(\Delta A) (TV) (\text{Glucose Molecular Weight}) (F)}{(\epsilon)(d)(SV)(\text{Conversion Factor for } \mu\text{g to mg})}$$

$$\text{mg glucose/ml} = \frac{(\Delta A) (TV) (180.2) (F)}{(6.22) (1) (SV) (1,000)}$$

$$\text{mg glucose/ml} = \frac{(\Delta A) (TV) (F) (0.029)}{(SV)}$$

$$\Delta A = A_{\text{Test}} - A_{\text{Total Blank}}$$

TV = Total Assay Volume (ml)

SV = Sample Volume (ml)

Glucose MW = 180.2 g/mole or equivalently 180.2 µg/µmoles

F = Dilution Factor from Sample Preparation

ϵ = Millimolar Extinction Coefficient for NADH at 340 nm

Millimolar $^{-1} \text{cm}^{-1}$ or equivalently (ml/µmoles)(1/cm)

d = Light path (cm) = 1 cm

1,000 = Conversion Factor for µg to mg

References

1. Bondar, R.J.L., and Mead, D.C., Clin. Chem. **20**, 586-590 (1974).
2. Kunsst, A., *et al.*, Methods of Enzymatic Analysis, 3rd Edition, Bergmeyer, H.U., ed., Academic Press (New York, NY: 1984) Volume 2, 163-172.
3. Southgate, D.A. T., Determination of Food Carbohydrates, Applied Science Publishers (London, UK: 1976).

CMH/MAM 9/04

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.