VAJA: Določanje specifične aktivnosti katalaze in glutation-S-transferaze v škrgah in hepatopankreasu mediteranske klapavice

1. Materiali in reagenti

1.1 Biološki material

- Škrge klapavice (*Mytilus galloprovincialis*)
- Hepatopankreas klapavice (*Mytilus galloprovincialis*)

1.2 Reagenti

- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)
- Dikalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4)
- Vodikov peroksid (H_2O_2)
- Destilirana voda
- MQ-voda

Razmisli:

1. Kakšni sta glavni funkciji škrg in hepatopankreasa pri klapavici?
2. Zakaj bi lahko pričakovali razlike v aktivnosti CAT in GST med škrgami in hepatopankreasom?
3. Kaj je oksidativni stres in kako je lahko povezan z izpostavljenostjo organizma mikroplastiki ali onesnaževalom?

1.3 Pufri in reakcijska mešanica

1.3.1 Kalij-fosfatni pufer (100 mM, pH 7,4)

Pufer se uporablja za homogenizacijo tkiv in po potrebi za redčenje vzorcev.

1. Pripravimo 100 mM raztopino KH_2PO_4 tako, da natehtamo 8,164 g KH_2PO_4 in dodamo destilirano vodo do končnega volumna 600 mL.
2. Pripravimo 100 mM raztopino K_2HPO_4 tako, da natehtamo 10,45 g K_2HPO_4 in dodamo destilirano vodo do končnega volumna 600 mL.
3. Raztopini zmešamo tako, da raztopini KH_2PO_4 postopoma dodajamo raztopino K_2HPO_4 do doseženega pH 7,4.
4. Po potrebi pH dodatno prilagodimo z eno od obeh komponent.
5. Pufer dobro premešamo in shranimo pri 4 °C.

1.3.2 Kalij-fosfatni pufer (50 mM, pH 7,0)

Pufer se uporablja za pripravo reakcijske mešanice pri določanju aktivnosti katalaze.

1. Pripravimo raztopini KH_2PO_4 in K_2HPO_4 v destilirani vodi.
2. Z mešanjem z MQ-vodo v razmerju 1 : 1 dosežemo končno koncentracijo 50 mM.
3. pH uravnamo na 7,0.
4. Pufer dobro premešamo in shranimo pri 4 °C.

1.3.3 Reakcijska mešanica (H_2O_2 v 50 mM kalij-fosfatnem pufru)

1. V 10 mL 50 mM kalij-fosfatnega pufra (pH 7,0) dodamo 11 µL H_2O_2.
2. Končna koncentracija H_2O_2 v reakcijski mešanici znaša 10,2 mmol/L.
3. Reakcijsko mešanico pripravimo sproti, glede na število vzorcev, na primer za 10–20 meritev.
4. Raztopino zaščitimo pred svetlobo z aluminijasto folijo in do uporabe hranimo na ledu.

2. Naprave in laboratorijski pripomočki

- Potter-Elvehjem homogenizator
- Centrifuga z možnostjo hlajenja na 4 °C
- Eppendorf centrifugirke oziroma mikrocentrifugne epruvete
- Pipete in ustrezni nastavki
- Analitična tehtnica
- pH-meter
- Hladilnik (4 °C)
- Zamrzovalnik (−80 °C)
- Ledomat ali posoda z ledom
- UV-prosojna mikrotiterska plošča
- Čitalnik mikrotiterskih plošč SPARK

3. Postopek

3.1 Odvzem vzorcev tkiv

1. Pred začetkom poskusa pripravimo in označimo epice za vzorce škrg in hepatopankreasa za vse encimske teste (SOD, CAT in GST).
2. Za encimske teste odvzamemo skupne vzorce, ki vključujejo tkiva ____ školjk iz vsakega akvarija.
3. Školjke položimo na pladnje iz nerjavečega jekla.

4. Čim hitreje po odvzemu školjk iz vode izrežemo škrge in hepatopankreas.
5. Tkivi odcedimo na kosu papirnate brisače in vsako posebej prenesemo v vnaprej označeno epico.
6. Vzorce med odvzemom hranimo na ledu, nato pa jih shranimo v zamrzovalniku pri −80 °C.
7. Preostanek školjke zavržemo.

3.2 Homogenizacija tkiv in priprava beljakovinskega ekstrakta

8. Priprava homogenizacijskega pufra: Pripravimo 100 mM kalij-fosfatni pufer (KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,4) po postopku, opisanem v poglavju 1.3.2. Do uporabe ga shranimo pri 4 °C.
9. Homogenizacija: Vsak vzorec tkiva homogeniziramo v kalij-fosfatnem pufru v razmerju 1 : 3 (mokra masa tkiva : volumen pufra) s Potter-Elvehjemovim homogenizatorjem. Med celotnim postopkom vzorce ohranjamo na ledu.
10. Centrifugiranje: Homogenate prenesemo v mikrocentrifugirke in jih centrifugiramo 40 minut pri 10.000 rpm in 4 °C.
11. Priprava beljakovinskega ekstrakta: Po centrifugiranju supernatant previdno odpipetiramo v nove, ustrezno označene mikrocentrifugirke. Pazimo, da pri odpipetiranju ne zajamemo usedline.
12. Shranjevanje: Pripravljene beljakovinske ekstrakte shranimo pri −80 °C do določanja aktivnosti katalaze (CAT).

Razmisli:

1. Zakaj tkiva med homogenizacijo in pripravo vzorcev hranimo na ledu?
2. Kakšen je namen centrifugiranja homogenata? Kateri del vzorca uporabimo za določanje encimske aktivnosti in zakaj?
3. Zakaj je pomembno, da za primerjavo aktivnosti encimov uporabimo ustrezno količino homogenata oziroma beljakovin?

3.2 Priprava vzorcev za določanje specifične aktivnosti katalaze

1. Supernatante pred meritvijo odtalimo na ledu.
2. Vzorce po potrebi redčimo s 100 mM kalij-fosfatnim pufrom (pH 7,4).
3. Začetna priporočena redčitev homogenata je 1:3. Po potrebi preizkusimo tudi dodatne redčitve, in sicer 5-kratno, 10-kratno in 15-kratno.
4. Preizkusimo različne kombinacije volumna homogenata in reakcijske mešanice, pri čemer mora končni volumen reakcije znašati 300 µL.
5. Preverimo linearnost meritev. Zaželena je vrednost R^2, višja od 0,96, optimalno pa višja od 0,98.

3.3 Določanje specifične aktivnosti katalaze v mikrotiterski plošči

Merilni pogoji

Parameter	**Nastavitev**
Valovna dolžina	240 nm
Temperatura	25 °C
Skupni čas merjenja	1 minuta
Interval merjenja	10 sekund
Vrsta plošče	UV-prosojna mikrotiterska plošča
Končni volumen reakcije	300 µL

Potek meritve

1. Za vsak vzorec pripravimo eno meritev slepega vzorca (blank) in tri tehnične ponovitve vzorca.
2. V ustrezne vdolbinice mikrotiterske plošče odpipetiramo po 15 µL vzorca.
3. Ploščo namestimo v čitalnik SPARK.
4. V vsako vdolbinico dodamo 285 µL reakcijske mešanice, ki vsebuje H_2O_2 v 50 mM kalij-fosfatnem pufru (pH 7,0).
5. Takoj po dodatku reakcijske mešanice začnemo merjenje.
6. Absorbanco merimo pri 240 nm vsakih 10 sekund v skupnem trajanju ene minute.

Razmisli:

1. Kakšna je funkcija katalaze v celici? Zapišite reakcijo, ki jo katalizira.
7. Zakaj pri določanju aktivnosti katalaze merimo absorbanco pri 240 nm?
8. Zakaj absorbanca med reakcijo upada? Kaj nam pove hitrost tega upadanja o aktivnosti katalaze?
9. Zakaj je treba preveriti linearnost meritve in po potrebi uporabiti različne redčitve vzorca?
10. Kakšen je namen slepega vzorca (blank) in tehničnih ponovitev?

3.3.1 Priprava vzorcev za določanje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze

Za določanje aktivnosti GST uporabimo iste beljakovinske ekstrakte kot pri določanju aktivnosti katalaze (CAT). Homogenati morajo biti pripravljeni v 100 mM kalij-fosfatnem pufru (pH 7,4).

Pred meritvijo vzorce odtalimo na ledu.

3.3.2 Priprava reagentov za določanje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze

Reagente pripravimo za eno mikrotitersko ploščo.

Raztopina A – Cl-2,4-DNB

1. Raztopimo 10,128 mg Cl-2,4-DNB (Sigma, Cat. No. 237329-10G) v 1 mL 96-% etanola.
2. Dodamo 800 µL pripravljene raztopine Cl-2,4-DNB v 9,2 mL 100 mM kalij-fosfatnega pufra (pH 6,5).
3. Raztopina postane bela.

Raztopina B – reducirani L-glutation

1. Raztopimo 3,07 mg reduciranega L-glutationa (Sigma, Cat. No. G4251-5G) v 5 mL 100 mM kalij-fosfatnega pufra (pH 6,5).

Za pripravo reagentov za tri mikrotiterske plošče potrebujemo:

- 30 mL raztopine B,
- 15 mL raztopine A.

3.3.3 Merjenje specifične aktivnosti glutation-S-transferaze

Merilni pogoji

- Valovna dolžina: 340 nm
- Temperatura: 25 °C
- Trajanje meritve: 10 minut
- Merilni interval: 20 sekund

Postopek

1. V vdolbinice mikrotiterske plošče odpipetiramo homogenat:
    - hepatopankreas: 50 µL,
    - škrge: 10 µL.
2. Dodamo 100 µL raztopine B.
3. Nato dodamo 50 µL raztopine A.
4. Takoj po dodatku raztopine A začnemo meriti absorbanco pri 340 nm in temperaturi 25 °C. 5. Absorbanco merimo 10 minut v intervalih po 20 sekund.

3.3.4 Izračun aktivnosti GST

Aktivnost GST izrazimo v nmol produkta/min/mg proteinov. Pri izračunu uporabimo ekstinkcijski koeficient $\varepsilon = 9600\ L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$.

Razmisli:

1. Kakšna je vloga glutation-S-transferaze pri razstrupljanju celic?

2. Kakšno vlogo imata reducirani glutation (GSH) in substrat CDNB v reakciji, ki jo spremljamo?
3. Zakaj pri določanju aktivnosti GST spremljamo absorbanco pri 340 nm in kako se ta spreminja med reakcijo?
4. Zakaj moramo pri izračunu specifične aktivnosti upoštevati količino beljakovin v vzorcu?

3.4 Določanje koncentracije proteinov z BCA metodo v mikrotiterski plošči

Metoda BCA (bicinhoninska kislina) temelji na kolorimetričnem določanju celokupnih proteinov. Koncentracijo proteinov določimo na podlagi absorbance pri 562 nm in umeritvene krivulje, pripravljene iz standardov govejega serumskega albumina (BSA). Protokol je pripravljen na podlagi navodil proizvajalca Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

3.4.1 Priprava reagentov

Delovna raztopina (Working Reagent, WR)

1. Pred pripravo izračunamo potreben volumen delovne raztopine glede na število standardov, vzorcev in ponovitev.
2. Zmešamo 50 delov reagenta A in 1 del reagenta B (razmerje 50 : 1).
3. Reagenta dobro premešamo. Ob dodatku reagenta B v reagent A lahko sprva nastane motnost, ki ob mešanju izgine.
4. Pripravimo toliko delovne raztopine, da za vsako vdolbinico zagotovimo 200 µL.

3.4.2 Priprava standardov BSA

Za pripravo umeritvene krivulje uporabimo standard govejega serumskega albumina (BSA) s koncentracijo 2000 µg/mL. Standarde pripravimo z ustreznim redčenjem v razredčilu, ki je enako oziroma čim bolj podobno tistemu, v katerem so pripravljeni vzorci.

Standard	**Končna koncentracija BSA (µg/mL)**
A	2000
B	1500
C	1000
D	750
E	500
F	250
G	125
H	25
I (slepi vzorec)	0

Standarde pripravimo po shemi redčenja proizvajalca. Za slepi vzorec uporabimo samo razredčilo brez BSA.

3.4.3 Priprava vzorcev

1. Pripravimo beljakovinske ekstrakte tkiv, shranjene pri −80 °C.
2. Vzorce odtalimo in jih po potrebi ustrezno razredčimo.
3. Za standardni postopek v mikrotitersko ploščo odpipetiramo 25 µL posameznega vzorca. Vsak vzorec in standard analiziramo v ustreznem številu ponovitev.
4. Na ploščo nanesemo tudi standarde BSA in slepi vzorec.

3.4.4 Določanje koncentracije proteinov

Merilni pogoji

- Volumen vzorca oziroma standarda: 25 µL
- Volumen delovne raztopine: 200 µL
- Skupni volumen v vdolbinici: 225 µL
- Inkubacija: 30 minut pri 37 °C
- Valovna dolžina: 562 nm

Postopek

1. V ustrezne vdolbinice mikrotiterske plošče odpipetiramo 25 µL posameznega standarda BSA ali vzorca.
2. V vsako vdolbinico dodamo 200 µL delovne raztopine WR.
3. Ploščo mešamo na stresalniku za mikrotiterske plošče 30 sekund.
4. Ploščo pokrijemo in inkubiramo 30 minut pri 37 °C.
5. Po inkubaciji ploščo ohladimo na sobno temperaturo.
6. Izmerimo absorbanco pri 562 nm s čitalnikom mikrotiterskih plošč.
7. Od absorbance posameznih standardov in vzorcev odštejemo povprečno absorbanco slepega vzorca.

3.4.5 Izračun koncentracije proteinov

1. Iz povprečnih korigiranih absorbanc standardov BSA pripravimo umeritveno krivuljo, ki prikazuje odvisnost absorbance od koncentracije proteinov.
2. Na podlagi umeritvene krivulje določimo koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu.
3. Pri razredčenih vzorcih izračunano koncentracijo pomnožimo s faktorjem redčenja, da dobimo koncentracijo proteinov v prvotnem vzorcu.

Koncentracijo proteinov izrazimo v µg/mL ali mg/mL. Dobljene vrednosti uporabimo pri izračunu specifične aktivnosti encimov, izražene na mg proteinov.

Razmisli:

1. Na katerem principu temelji BCA metoda za določanje koncentracije proteinov?
2. Kaj prikazuje umeritvena krivulja in kako jo uporabimo za določanje koncentracije proteinov v neznanem vzorcu?
3. Zakaj koncentracijo proteinov določamo pri izračunu specifične encimske aktivnosti CAT in GST?

Za diskusijo:

1. Izrišite absorbanco v odvisnosti od časa za izbrani vzorec CAT in vzorec GST. Kako se oblika krivulje razlikuje med encimoma?
2. Kako iz časovnega poteka absorbance določimo začetno hitrost reakcije za CAT in GST?
3. Kaj bi lahko pomenila nelinearna sprememba absorbance med meritvijo? Navedite vsaj dva možna vzroka.
4. Zakaj aktivnosti CAT in GST ne moremo neposredno primerjati samo na podlagi spremembe absorbance na minuto?
5. Zakaj encimsko aktivnost izrazimo na miligram beljakovin in ne samo na gram tkiva?
6. Če bi imel vzorec A večjo encimsko aktivnost kot vzorec B, ali bi to nujno pomenilo, da je bil organizem A izpostavljen večjemu oksidativnemu stresu? Pojasnite.
7. Če bi pri izpostavljenih klapavicah ugotovili povečano aktivnost CAT, zmanjšano aktivnost GST ali obratno, kako bi lahko pojasnili takšne rezultate?
8. Kako lahko mikroplastika in nanjo vezana onesnaževala vplivajo na oksidativno ravnovesje pri klapavicah?
9. Ali lahko povečana aktivnost antioksidativnega encima pomeni zaščitni odziv organizma? Kdaj bi lahko bila aktivnost encima zmanjšana?
10. Zakaj bi bilo pri ocenjevanju učinkov onesnaževal smiselno hkrati meriti več biomarkerjev namesto samo aktivnosti CAT ali GST?
11. Katere dodatne meritve bi vključili, da bi bolje ocenili oksidativni stres in morebitne poškodbe celic?
12. Ali bi na podlagi ene same meritve CAT ali GST lahko sklepali o celotnem zdravstvenem stanju klapavice? Utemeljite odgovor.