

ANKARA UNİVERSİTESİ

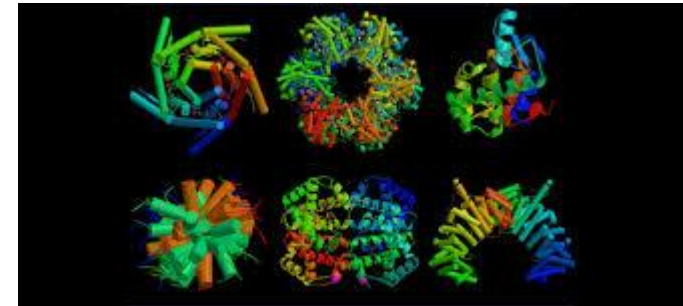
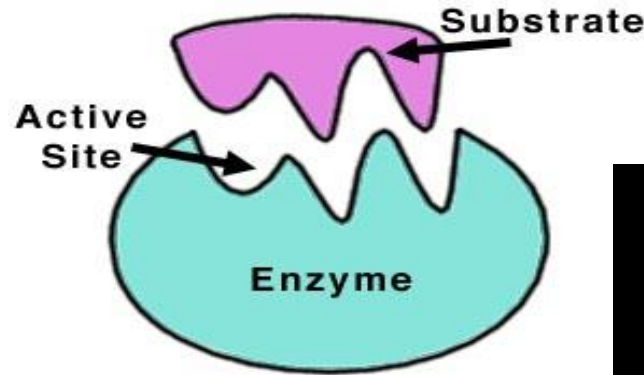
BIYOTEKNOLOJİ

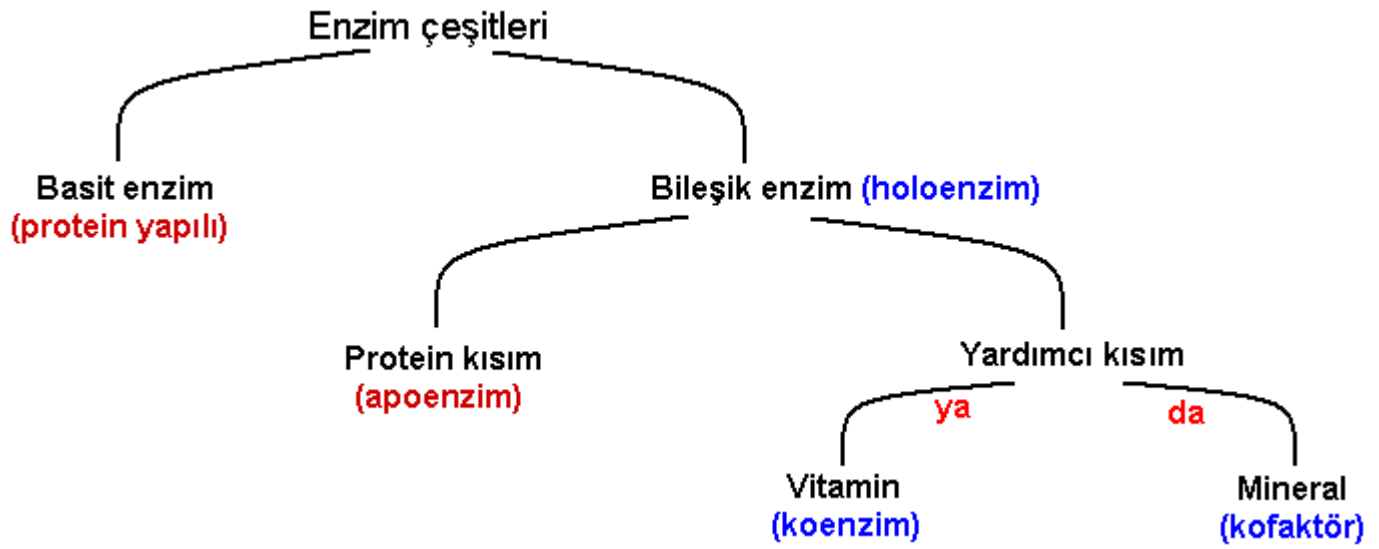
ENSTİTÜSÜ

Enzim Aktivite Tayinleri

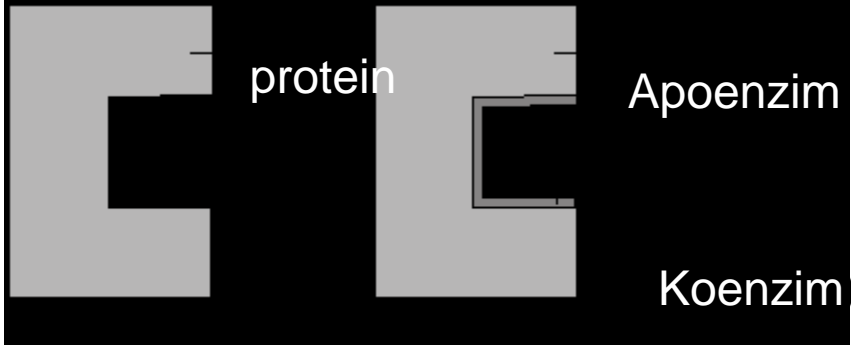
Doç. Dr. Demet Cansaran-Duman

- * **Enzimler** protein yapısında ve doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenen biyolojik katalizörlerdir.
- * Etki ettikleri maddeye **SUBSTRAT** denir ve bu maddenin sonuna "**ase=az**" eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimenin çeşidine göre adlandırılırlar.



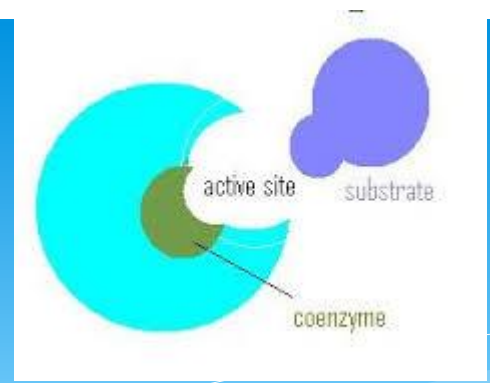


- * **Basit Enzimler:** Sadece proteinden meydana gelmiş enzimlerdir. Bunlara en iyi örnek sindirim enzimleri ve üreyi parçalayan üreaz
- * **Bileşik Enzimler:** Bileşik enzimler iki kısımdan meydana gelir.
 - Protein + Vitaminler
 - Protein + Mineral maddeler veya metal iyonlarıdır.



Basit enzim

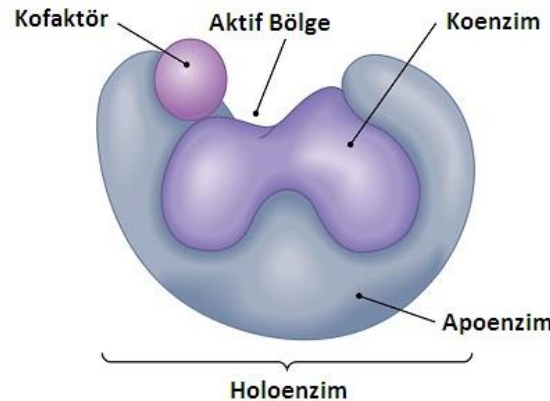
Bileşik enzim



Bu enzimlerin protein kısmına **apoenzim**,
vitamin kısmına **koenzim** veya **prostatik grup**

Organizmalarda vitamin veya metal iyonları eksik olursa protein kısımları reaksiyonu gerçekleştiremez. Koenzim metal iyonu ise buna "**Kofaktör**" denir.

Bazı durumlarda koenzim apoenzim kısmına sıkıca bağlanmıştır; bu bağlanan kısma "**Prostatik grup**"; prostetik grupla apoenzim kısmının her ikisine birden "**Holoenzim**" denir.



Her enzimin 4 rakamlı bir numarası vardır, örneğin,

EC 3.6.1.3.ATP fosfohidrolaz

Enzyme Commission number (E.C. Number)

da birinci numara sınıfını,
ikinci numara alt sınıfını,
üçüncü numara grubunu,
dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir.

[EC 1](#) Oxidoreductases

[EC 2](#) Transferases

[EC 3](#) Hydrolases

[EC 4](#) Lyases

[EC 5](#) Isomerases

[EC 6](#) Ligases

<u>Enzyme</u>	<u>Substrate</u>
Amylase	Starch (Nişasta)
Maltase	Maltose
Sucrase	Sucrose
Lipase	Fats
Pepsin	Proteins

ENZİM NASIL ÇALIŞIR ?

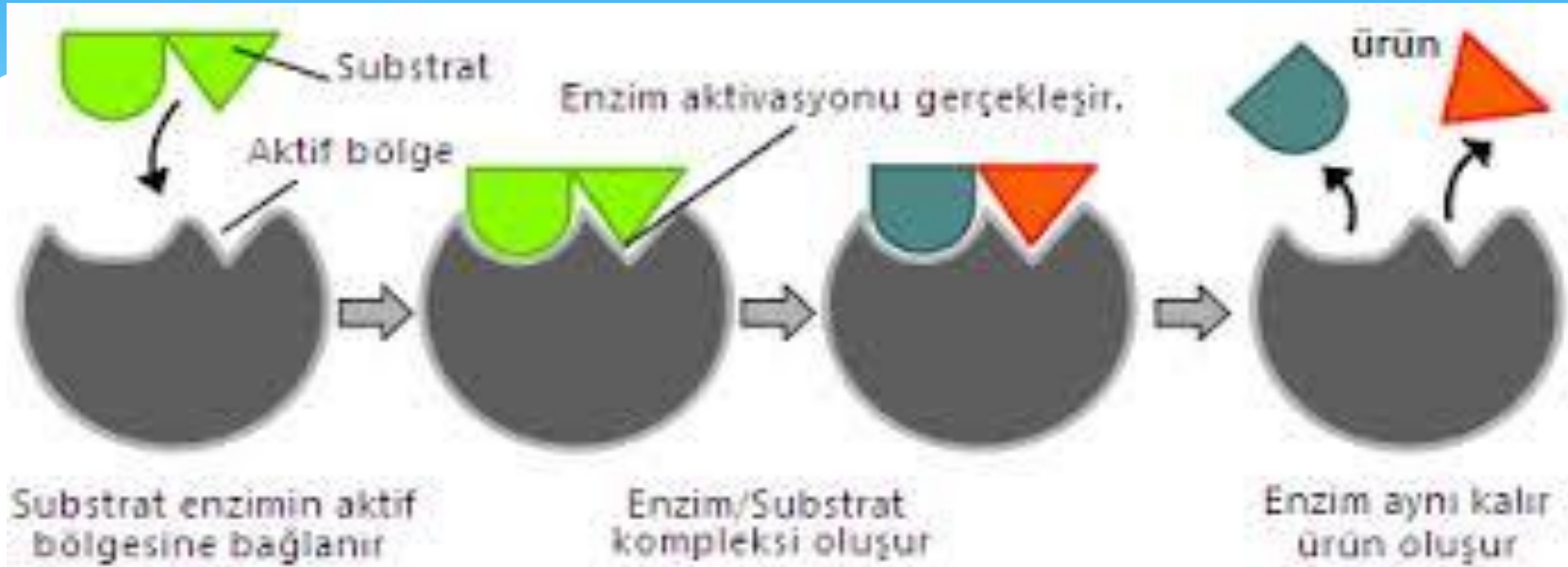
✓ Enzimin hangi substratla çalışılacağını saptayan kısmı **apoenzim** kısmıdır. Dolayısıyla apoenzim kısmıyla substrat arasında bir ilişki vardır.

✓ **Koenzim** kısmı daha çok kimyasal bağa yakın olarak işlev gösterir, örneğin *ester bağlarını* parçalar vs.

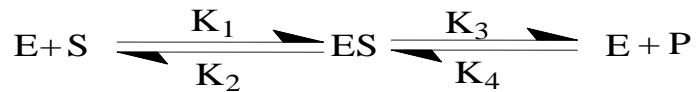
Bu anlamda enzimin **apoenzim** kısmı bir ya da birkaç yerinden (aktif bölgelerden) substrat molekülüne yapışır ya da bağlanıyor (yani bir enzim-substrat kompleksi oluşturuyor) ve

✓ bu arada **koenzim** kısmı substrat üzerindeki bağlarla gerçek anlamda birleşmeye veya bağlanmaya giderek onu parçalar.

Enzimler Nasıl Çalışır ???



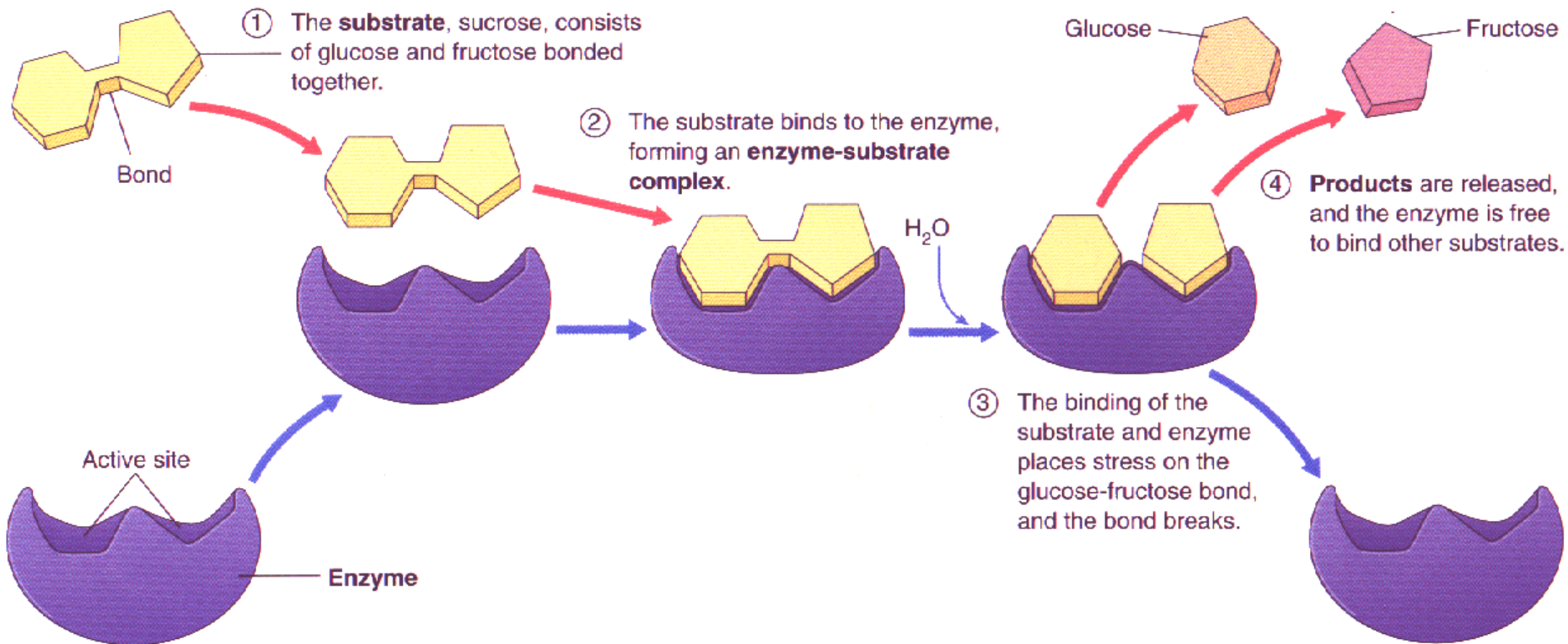
Genel enzim reaksiyonu şeklinde özetlenebilir.



E= Enzim; S= Substrat; ES= Enzim-Substrat Kompleksi; P= Ürün' dür.

- * **Anahtar kilit modeli:** Bu modelde enzimin aktif merkezi substrata birebir benzer.
- * **Uyarılmış uyum modeli:** Bu modele göre enzimin aktif merkezi,enzim substrattan uzakta olduğu dönemde substrata benzerlik göstermez. Enzim substrata yaklaştıkça enzimin aktif merkezi substratın şeklini alır.
- * **Substrat ile enzim arasında kovalent bağlar bulunmaz.** H bağları, hidrofobik bağlar, iyonik ve Van der Waals bağları enzimle substrat arasındaki nonkovalent bağlardır.

Enzimler Nasıl Çalışır ???



Enzimler kimyasal reaksiyonları gerçekleştirdiklerinde bazı faktörlerin etkisi altında kalırlar. Bunlar;

Isı: Her enzim reaksiyonunun optimal bir ısı seviyesi vardır. İnsanda bu ısı 36,5 derecedir. 0 derecede enzimler canlılıkta kaybedilmeyebilir. Genel olarak enzimler 60C'de bozulurlar.

pH: (asitlik-bazlık oranı): Her reaksiyonun gerçekleşebilmesi ortamın pH'ını belirleyen belli oranda $[[H+]]$ ve $[[OH-]]$ iyonları konsantrasyonu olmasına bağlıdır.

* **Substrat konsantrasyonu:** Ortamda reaksiyon hızını artırıcı yapılardan biride enzim ve substrat miktarıdır. Her ikisinin miktarı belirli oranlarda artırılırsa reaksiyon hızı sürekli artar.

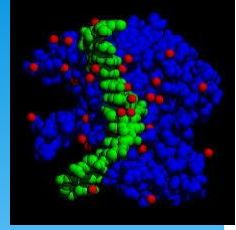
Su: Enzim reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için ortamda belirli oranda su olması gerekir. Çünkü moleküllerin birbirine çarparak reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için hareketi sağlayacak sıvı bir ortamın olması gerekir.

*Enzimler hücrede bir **TAKIM** halinde çalışır;
birinin son ürünü kendisinden sonraki enzimin substratını yapar,

*örneğin, **amilaz** enzimi **nişastayı** iki zincirli **maltoza**,
maltaz enzimi ise maltozu tek zincirli **glikoza** çevirir.

*Bazı enzimler ortama yalnız belirli iyonlar eklendiğinde etkindirler,
örneğin bazı enzim zincirine ancak Mg^{++} iyonu eklenince glikozu
laktik aside çevirebilir. Tükürükteki amilaz nişastayı yalnız Cl
iyonlarının bulunduğu ortamda parçalayabilir.

Biyoteknolojide Enzimler



*Zamk kaplama malzemeleri gibi, kağıt endüstrisinde, koltuk, döşeme endüstrisi gibi alanlarda **ESTERAZLAR**

*Deterjan sanayinde **PROTEAZLAR, LİPAZLAR**

*Gıda endüstrisinde örneğin meyvesularında **PEKTİNAZLAR**

*Biodegradable plastikde polimer parçalayan organizmaların ürettiği enzimler

*Deri ve tekstil endüstrisinde zararlı kimyasalların yerini alabilecek mikroorganizmaların ürettiği enzimler

*Biyoetanol üretiminde özellikle mısır, bambo.....



Enzim Aktivitelerinin Tayininde Kullanılan Yöntemler

*Genellikle ya kaybolan ya dönüşen **substrat** miktarı yada meydana gelen **ürün** miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülür.

*Enzim aktivite tayininde yöntem seçerken metodun pratik oluşuna ve kısa sürede yapılmasına, ayrıca hassas oluşuna da özen göstermek gerekir.

Enzim Aktivitelerinin Tayininde Kullanılan Yöntemler

- **Spektrofotometrik yöntem,** Pekçok enzim substratı, ürünü veya koenzimi, görülen ışıpta veya ultraviyole ışıpta bir tepe değeri göstererek, absorbands vermektedir.
- **Monometrik yöntem,** Bir komponenti gaz olan enzimlerin aktivitesini ölçmek için kullanılan yöntemdir. Örneğin; oksidazlarla oksijen alınımı ve dekarboksilazlarla karbon dioksit salınımı bu yöntemle ölçülür.
- **Thunberg yöntemi,** Çok sayıda dehidrogenaz enziminin aktivitesi bu yöntem kullanılarak ölçülür
- **Elektrot yöntemi,** Cam elektrotlarla oluşan ürünlerin ölçülmesi esasına dayanır.
- **Polimerik yöntem,** Pekçok enzimin substratı optikçe aktiftir. Eğer üründe optik aktivite değişmesi görülecek olursa bu yöntem kullanılmaktadır.
- **Kromatografik yöntem,** Diğer yöntemlerle bir ölçme yapılamadığında bu yöntemle başvurulur.
- **Kimyasal tayin yöntemi,** Birçok enzim reaksiyon başladıktan sonra belirli zaman aralıklarında karışımdan örnek alıp, substrat ve ürünün kimyasal yöntem ile miktarı tayin edilir.

Enzim Aktivitelerinin Tayininde Kullanılan Birimler


*Aktivite tayininde kullanılan bazı terimleri ve ne anlama geldiğini inceleyelim:

- * **Ünite:** Bir mikromol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri U şeklinde gösterilmektedir.
- * **Spesifik Aktivite:** Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilir. Spesifik aktivite ünite/mg protein olarak kabul edilmektedir. Buna göre spesifik aktiviteyi aşağıdaki gibi yazabiliriz; Örneğin; 5 mg proteinde 750 ünite ölçmüşsek, bu enzimin spesifik aktivitesi 150 U/mg bulunur.

Superoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini

- * SOD'lar olağanüstü katalitik etkinlikte çalışan metalloproteinlerdir. $O_2^{\cdot-}$ 'i H_2O_2 'e dönüştürme rolü olan SOD'ların aktif merkezlerinde yer alan metal iyonlarına göre üç izoenzimi vardır. Bunlar bakır ve çinko içeren Cu/ Zn SOD, mangan içeren Mn SOD ve demir içeren Fe SOD'lardır.



- 
- * Yapılan alışmalarda; SOD'ların ifadesindeki artışların biyotik ve abiyotik strese bağlı oluşan oksidatif stresle başa çıkmada ve bitkilerin stres koşulları altında canlılığı sürdürmesine katkı sağlamada önemli rolleri olduğu ileri sürülmüştür.

SOD enzim aktivitesi tayininde kullanılan farklı direk ve indirekt analiz metotları geliştirilmiştir. Bunlar arasında güvenilirlik ve kullanım kolaylığı açısından en çok tercih edileni **nitroblue tetrazolium (NBT)** metodudur.

- * Bu amaçla SOD enzim aktivitesi tayininde **19160 SOD determination kit (Sigma)** kullanılmaktadır.

Kit İçeriği

- a) WST Solution 5 ml x 1
- b) Enzyme Solution 100 μ l x 1
- c) Buffer Solution 100 ml x 1
- d) Dilution Buffer 50 ml x 1
- e) Manual

Gerekli ekipmanlar

- a) Plate reader (450 nm filter)
- b) 96-well microplate
- c) 10 μ l & 100-200 μ l pipettes and a multi-channel pipette
- d) Incubator
- e) Superoxide dismutase (SOD), if necessary for the preparation of an inhibition curve

Çalışma solusyonlarının hazırlanması

a) **WST working solution**: Dilute 1 ml of WST Solution with 19 ml of Buffer Solution.

b) **Enzyme working solution**: Centrifuge the Enzyme Solution tube for 5 sec. Mix by pipeting, and dilute 15 μ l of Enzyme Solution with 2.5 ml of Dilution Buffer.

c) **SOD Solution** (for assay monitoring, if necessary): Dilute SOD with Dilution Buffer to prepare SOD Standard

*Solution as follows:

200 U/ml, 100 U/ml, 50 U/ml, 20 U/ml, 10 U/ml, 5 U/ml, 1 U/ml, 0.1 U/ml, 0.05 U/ml, 0.01 U/ml, 0.001 U/ml

Uygulanışı

- * 1) Add 20 μ l of sample solution to each sample and blank 2 well, and add 20 μ l of ddH₂O (double distilled water) to each blank 1 and blank 3 well.
- * 2) Add 200 μ l of WST Working Solution to each well, and mix.
- * 3) Add 20 μ l of Dilution Buffer to each blank 2 and blank 3 well.
- * 4) Add 20 μ l of Enzyme Working Solution to each sample and blank 1 well, and then mix thoroughly*.
- * 5) Incubate the plate at 37 °C for 20 min.
- * 6) Read the absorbance at 450 nm using a microplate reader.

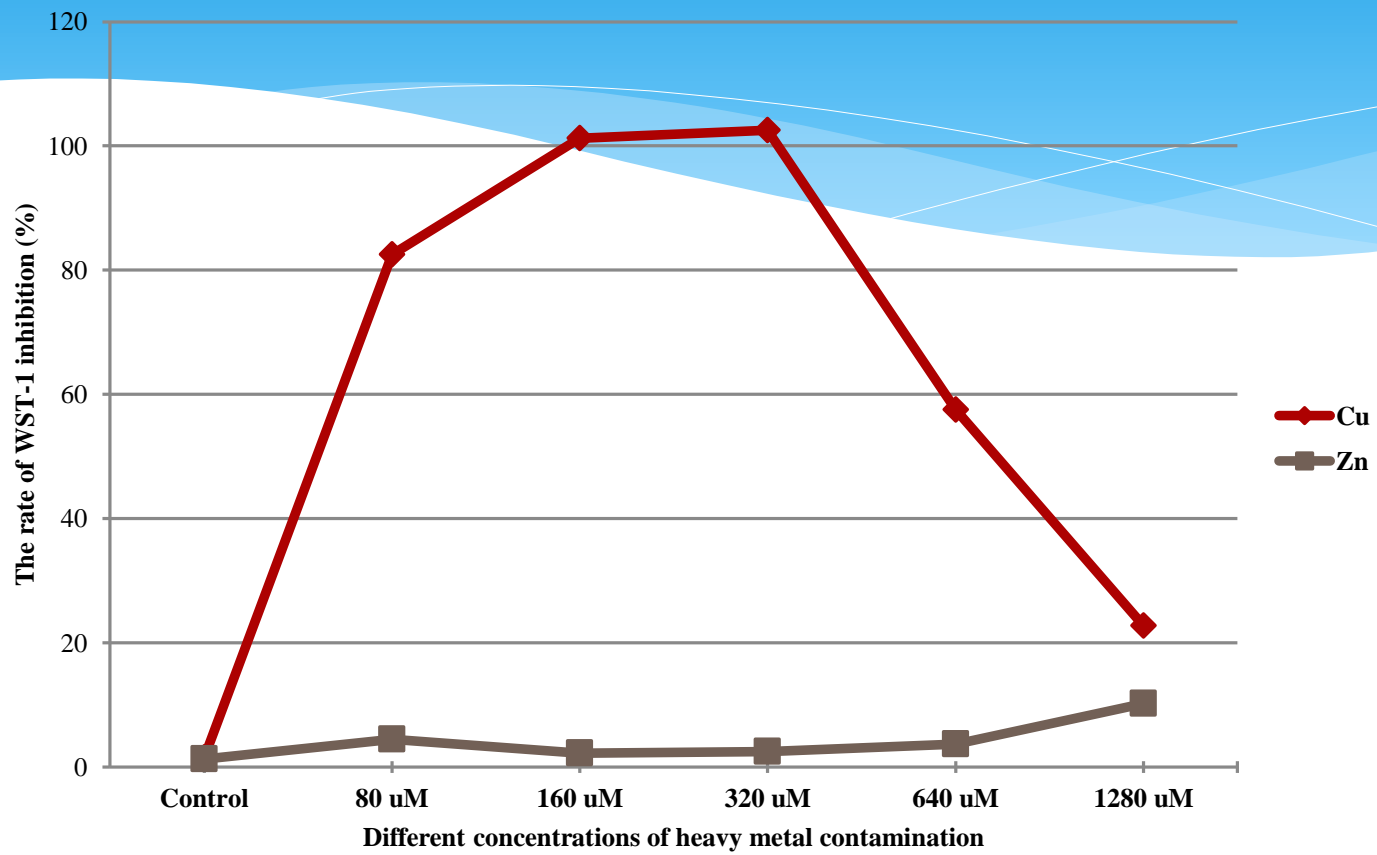
	Sample	Blank1	Blank2	Blank3
Sample solution	20 µl		20 µl	
ddH ₂ O		20 µl		20 µl
WST working solution	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzyme working solution	20 µl	20 µl		
Dilution buffer			20 µl	20 µl

Tablo : Örnekler, blank 1, 2 ve 3 için gerekli solusyon miktarları

İnhibisyon oranları (%) hesaplanır ve Grafikler oluşturulur

Calculate the SOD activity (inhibition rate %) using the following equation:

- SOD aktivitesi (inhibition rate %) = $\{[(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3}) - \text{Asample} - \text{Ablank 2}]/ (\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3})\} \times 100$



MDA (Malondialdehyde Analizi)= Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

- * Oksidatif strese neden olan serbest radikaller, yapılarında bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan atom ya da moleküllerdir. Serbest radikaller arasında oksijen serbest radikalleri en önemlileridir. Oksijen ortaklanmamış elektronları nedeniyle indirgenme eğiliminde olduğundan toksik özellik gösterir.

- * Hücre içinde oksijenin son indirgenme basamağı sudur. Ancak oksijenin indirgenmesi sırasında reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilen ara ürünler oluşur. Bu ara ürünlerin başlıcaları; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-) ve hidrojen peroksittir (H_2O_2). Bunlar arasında organizma içinde en aktif dolayısıyla en toksik olanı hidroksil radikalidir

- * Serbest radikaller hücreyi oluşturan tüm yapılarla reaksiyona girebilirler ancak bu etkileşime en hassas yapılar lipitlerdir. Serbest oksijen radikallerinin dokulara etkisi ile oluşan, lipit peroksidasyonu esnasında bir dizi reaksiyon sonucu meydana gelen, oldukça reaktif olan metabolik ürünlerden bir tanesi malondialdehit (MDA)'tir.

- * Plazma MDA düzeyinin belirlenmesi dokulardaki lipit peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin hassas göstergelerinden biridir. MDA uzun ömürlü olması ve yüksek reaktivitesi ile hücre içi ve hücre dışında bulunan protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan yapısal ve fonksiyonel hasarların ortaya çıkmasına neden olur. **Bu amaçla stres çalışmalarında canlıda stres oluşumunu göstermek için MDA analizi yapılır.**

Uygulanışı

- * 100 mg örnek %80'lik 1 ml alkol ile homojenize edilir. 3000 g de +4 °C'de 10 dk santrifüj edilir.
- * Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ikiye bölünür;
 - * 1 hacim alınır + 1 hacim %20'lik TCA (trichloroaceticacid) + 1 hacim %0,01'lik BHT (butylated hydroxytoluene) eklenir. (-TBA)
 - * 1 hacim alınır + 1 hacim %0,65 TBA (2-thiobarbituric acid) içeren %20'lik TCA + 1 hacim %0,01'lik BHT eklenir. (+TBA)
- * a ve b şeklinde ayrılmış ve yukarıdaki şekilde hazırlanmış olan tüpler 95 °C'de 25 dk inkübasyon sonrası ani bir şekilde soğutma amacıyla buza alınır.
- * Soğuyan örnek 3000 g'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant alınır.
- * Birinci aşamada 532-600 nm'de, ikinci aşamada ise 532-600-440 nm'de ölçülür.

Hesaplamalar

Spektrofotometrede okunan değerler ile yüzde MDA seviyelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

ABS=Absorbans

MDA=Malondialdehit

$$*((\text{ABS } 532+\text{TBA})-(\text{ABS } 600+\text{TBA})-(\text{ABS } 532-\text{TBA})-(\text{ABS } 600-\text{TBA}))= A$$

$$*((\text{ABS } 440+\text{TBA})-(\text{ABS } 600+\text{TBA}))\times 0,0971=B$$

$$*\text{nmolMDA/ml}=(A-B/157000)\times 10^6$$

Grafiklerin Oluşturulması ve Yorumlanması

