**Transaminacja**

Transaminacja jest kluczowym procesem w metabolizmie aminokwasów. Jest to proces katalizowany przez enzymy z klasy transferaz. Grupę prostetyczną tych enzymów stanowi fosforan pirydoksalu (witamina B6). Transaminacja polega naprzenoszeniu grup aminowych z różnych L-aminokwasów na jeden z trzech α-ketokwasów:

* pirogronian (reakcja katalizowana jest przez aminotransferazę alaninową),
* szczawiooctan (reakcja katalizowana jest przez aminotransferazę asparaginianowa),
* α-ketoglutaran (reakcja katalizowana jest przez aminotransferazę glutaminianową).

Produktem reakcji transaminacji jest nowy L-aminowkas oraz nowy α–ketokwas. Transaminazy są enzymami występującymi w mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych, wątrobie oraz mózgu.

**Bibułowa chromatografia podziałowa**

Chromatografia podziałowa jest jedną z metod chemii analitycznej, służąca do rozdziału mieszanin związków. Zasada chromatografii bibułowej opierająca się na różnej szybkości migracji poszczególnych jej składników przez nieruchomy ośrodek (bibuła). Układ chromatograficzny składa się z trzech zasadniczych elementów: fazy stacjonarnej, fazy ruchome (solwent) oraz mieszaniny badanych związków. Prędkość ruchu rozdzielanych związków jest wypadkową oddziaływań między substancjami chemicznymi tworzącymi analizowaną próbkę a fazą rozdzielczą i rozpuszczalnikiem.

Próbę badaną nanosi się punktowo na bibułę, po czym umieszcza się ją w komorze chromatograficznej wypełnionej eluatem. Faza ruchoma pod działaniem sił kapilarnych przemieszcza się wzdłuż bibuły prowadząc do rozdziału analizowanej próbki. Ze względu na różnice w prędkości rozdzielanych związków, w momencie zakończenia chromatografii znajdują się one na różnej wysokości w odniesieniu do czoła rozpuszczalnika. Chromatografie uważamy za zakończoną w momencie gdy czoło rozpuszczalnika dotrze do górnej krawędzi bibuły.

Wizualizacja mieszanin związków możliwa jest dzięki etapowi wywołania chromatogramów. Jedną z metod stosowanych w tym celu jest wybarwienie niewidocznych pasm rozdzielanej mieszaniny. Mieszaninę aminokwasów uwidaczniamy poprzez zastosowanie ninhydryny lub roztworu izatyny. Mechanizm ten polega na wykorzystaniu zdolności do konwersji związków bezbarwnych w barwne produkty. Efektem końcowym jest otrzymanie barwnych pasm na bibule.

Jakościowa analiza chromatogramów polega na analizie poszczególnych pasm (plamki) analizowanych związków z wykorzystaniem współczynnika RF. Wartość RF określa stosunek prędkości migracji pasma do prędkości migracji czoła solwentu oraz jest cechą charakterystyczną dla rozdzielanych związków. Współczynnik RF zależy głównie od zastosowanej fazy stacjonarnej i ruchomej, rodzaju zastosowanej bibuły, interakcji rozdzielanej mieszaniny związków oraz procedury doświadczenia. Obliczenie współczynnika RF polega na zastosowaniu równania przedstawionego niżej:

 Odległość od środka plamki do linii startu

 RF =

 Odległość od czoła solwentu do linii startu

**Zagadnienia do przygotowania:**

1. Wzory α-L-aminokwasów,
2. Metody wykrywania i oznaczania aminokwasów.
3. Reakcja aminokwasów z ninhydryną.
4. Chromatografia bibułowa aminokwasów.
5. Współczynnik RF.
6. Biosynteza i katabolizm aminkokwasów.
7. Przebieg reakcji katalizowanej przez aminotransferazę glutaminianową.

**Materiały i odczynniki:**

1. Aminotransferaza otrzymana z mięśnia sercowego świni,
2. 0,2 M alanina o pH 8,0,
3. 0,2 M kwas glutaminowy o pH 8,0,
4. 0,2 M kwas α-ketoglutarowy o pH 8,0,
5. 0,5 M fosforan disodowy – Na2HPO4 o pH 8,3,
6. 4 mM EDTA w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,5,
7. Amoniak stężony,
8. Mieszanina rozpuszczalników: etanol – butanol III rzędowy – amoniak – woda (60 :2 : 5 : 15),
9. Odczynnik ninhydrynowy.

**Cel ćwiczenia:**

1. Izolacja aminotransferazy glutaminianowej z mięśnia sercowego.
2. Wykazanie przebiegu reakcji transaminacji na przykładzie katalitycznego działania aminotransferazy glutaminianowej.

**Wykonanie**

1. **Otrzymywanie aminotransferazy glutaminianowej**

Zhomogenizować 2 g uprzednio rozdrobnionej tkanki mięśnia sercowego przy użyciu homogenizatora nożowego w 8 ml roztworu 4 mM EDTA w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,5. Powstały homogenat odwirować przy 1000 x *g* przez 10 minut. Do dalszych doświadczeń zachować płyn nadosadowy, w którym znajduje się aminotransferaza glutaminianowa.

1. **Sporządzenie mieszanin inkubacyjnych**

**2.1. Sporządzenie próby właściwej**

Do probówki wirowniczej odmierzyć:

0,2 ml 0,5 M fosforanu disodowego pH 8,3,

0,1 ml roztworu kwasu α-ketoglutarowego,

0,3 ml 0,2 M roztworu alaniny,

1,5 ml płynu nadosadowego.

Zawartość probówki wymieszać i umieścić natychmiast w łaźni wodnej o temperaturze 37oC **na 2 godziny**. Po inkubacji zawartość probówki **wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 1 minutę,** a następnieprzesączyć. Przesącz pozostawić do dalszych analiz.

* 1. **Sporządzenie próby kontrolnej**

Próbę kontrolną należy zacząć przygotowywać na 15 minut przed końcem inkubacji próby właściwej.

Pustą probówkę wirowniczą **wstawić do wrzącej łaźni wodnej** i dodawać kolejno:

0,2 ml 0,5 M fosforanu disodowego pH 8,3,

0,1 ml roztworu kwasu α-ketoglutarowego,

0,3 ml 0,2 M roztworu alaniny,

1,5 ml płynu nadosadowego zawierającego aminotransferazę glutaminianową.

Po dodaniu wszystkich składników próbę inkubować 10 minut. Następnie zawartość probówki przesączyć. Przesącz zachować do dalszej analizy.

1. **Chromatografia**

Na bibule *Whatman 1* o wymiarach 14,5 x 30 cm w odległości 3 cm od dolnego brzegu narysować **ołówkiem** linie startu, na której należy zaznaczyć pierwszy punkt w odległości 3,5 cm od lewego brzegu, natomiast trzy pozostałe w odległościach co 2,5 cm. Punkty te opisać kolejno od lewej pisząc pod nimi zwykłym ołówkiem symbole: ***Ala*** (miejsce naniesienia na bibułę alaniny), ***Glu*** (miejsce naniesienia na bibułę kwasu glutaminowego), ***K*** (miejsce naniesienia na bibułę próby kontrolnej) oraz ***W*** (miejsce naniesienia na bibułę próby właściwej) (Ryc. 1).

**3.1. Przygotowanie komory amoniakalnej**

Do szklanej komory wlać pod wyciągiem stężonego amoniaku, tak aby słup cieczy sięgał 0,5cm, po czym przykryć szczelnie pokrywą.

**3.2. Przygotowanie komory chromatograficznej**

Do szklanej komory wlać mieszaninę rozpuszczalników (solwent): etanol – butanol III rzędowy – amoniak – woda (60 : 20 : 5 : 15), w takiej ilości, aby dolny brzeg zawieszonej bibuły mógł być zanurzony 0,5 cm w solwencie. Komorę szczelnie przykryć pokrywą.

****

Rycina 1. Przygotowanie bibuły do chromatografii

**3.3. Nanoszenie próbek na bibułę chromatograficzną**

Na punkty zaznaczone na bibule jako ***Ala, Glu, K, W,*** nanieść szklaną kapilarą 1 krople odpowiedniego roztworu i wysuszyć strumieniem ciepłego powietrza (czynność powtórzyć dwukrotnie).

**3.4. Właściwa chromatografia**

* *Neutralizacja wolnych aminokwasów i kwaśnych soli*

Po naniesieniu prób, bibułę zawiesić w komorze amoniakalnej na 30 minut. Należy wykonać to bardzo ostrożnie gdyż chromatogramy **nie mogą** dotykać powierzchni roztworu amoniaku, a także stykać się ze sobą.

* *Rozwijanie chromatogramów*

 Z komory amoniakalnej bibułę przenieść do komory z mieszaniną rozpuszczalników (solwent) i zawiesić tak, aby dolny brzeg był zanurzony 0,5 cm w solwencie. Chromatogram rozwijać, aż czoło solwentu przejdzie na wysokość 20 cm od linii startu, po czym wyjąć z komory.

* *Suszenie chromatogramów*

 W pełni rozwinięte chromatogramy suszyć na powietrzu.

**3.5. Wywoływanie chromatogramów**

 Wysuszony chromatogram zanurzyć w odczynniku ninhydrynowym i pozostawić na kilka minut do wysuszenia. Zaobserwować pojawianie się barwnych plam aminokwasów na chromatogramie.

1. **Współczynnik RF**

 Na podstawie obliczonych współczynników RFprzeprowadzić identyfikację rozdzielonych aminokwasów.

Wnioski oraz uwagi należy wpisać do zeszytu.

**Piśmiennictwo:**

1. Edward Bańkowski Biochemia. *Podręcznik dla studentów uczelni medycznych*. Wydanie drugie. Elsevier Urban & Partner. Wrocław 2009.
2. B.D. Hames, N.M. Hooper, *Krótkie wykłady Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.
3. Jeremy M. Berg, Lubert Stryer, John L. Tymoczko *Biochemia* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
4. R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, W.W. Rodwell (red.) *Biochemia Harpera.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006.
5. Krzysztof Zwierz *Ćwiczenia z Biochemii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego*. Wydawnictwo Uczelniane Akademii Medycznej w Białymstoku, Białystok 2005.
6. Teresa Stelmaszyńska-Zgliczyńska, Piotr Laidler *Ćwiczenia z Chemii i Biochemii dla Studentów Medycyny i Stomatologii*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2001.