**Enzymy lizosomalne**

Lizosomy są niewielkimi pęcherzykami o nieregularnych kształtach otoczonymi pojedynczą błoną białkowo-lipidową. Występują w cytoplazmie. Główną funkcją lizosomów jest trawienie substancji bezużytecznych dla komórki.

W lizosomach znajduje się około 40 enzymów, które katalizują rozpad większości substancji występujących w komórce (białka, kwasy [nukleinowe](http://www.bryk.pl/s%C5%82owniki/s%C5%82ownik_biologiczny/86703-nukleinowe_kwasy.html), cukry i lipidy). Lokalizacja silnie działających enzymów w lizosomach zabezpiecza białka i inne cytoplazmatyczne składniki komórki przed przypadkowym zniszczeniem. Dodatkowym zabezpieczeniem jest kwaśne środowisko panujące wewnątrz lizosomów. Enzymy, które znajdują się w lizosomach są przystosowane do działania w środowisku kwaśnym; przypadkowe wydostanie się enzymów do cytoplazmy, gdzie wartość pH jest zdecydowanie wyższa, nie spowoduje wielkich szkód dla białek cytoplazmatycznych.

Glikokoniugaty (wielkocząsteczkowe związki zbudowane z łańcuchów oligosacharydowych połączonych z białkiem lub lipidem), tak jak i inne składniki organizmu, ulegają ciągłej wymianie polegającej na rozpadzie starych cząsteczek i syntezie nowych. Degradacja zachodzi głównie w lizosomach w wyniku działania znajdujących się tam enzymów (proteaz, endo- i egzoglikozydaz).

Egzoglikozydazy lizosomalne tworzą ciągi reakcji, w których substratem kolejnego enzymu jest produkt trawienia poprzedniego. N-acetylo-β-D-heksozoaminidaza (HEX) stanowi jeden z najaktywniejszych enzymów spośród egzoglikozydaz. Odcina ona reszty N-acetyloglukozoaminy lub N-acetylogalatozoaminy z nieredukującego końca łańcucha oligosacharydowego glikoprotein, glikolipidów i proteoglikanów. Aktywność tego enzymu wykazano niemal we wszystkich tkankach i narządach: nerkach, wątrobie, błonie śluzowej żołądka, śledzionie, korze mózgu, łożysku, płucach i fibroblastach skóry.

N-acetylo-β-D-heksozoaminidaza jest glikoproteiną zbudowaną z dwóch łańcuchów polipeptydowych: α i β, które występują w trzech możliwych kombinacjach. Izoenzym A ma budowę αβ, izoenzym B **-** ββ i izoenzym S – αα.

N-acetylo-β-D-heksozoaminidaza katalizuje różne reakcje, z których największe znaczenie ma degradacja gangliozydów GM2. Przy obniżeniu lub braku aktywności HEX w komórkach nerwowych dochodzi do gromadzenia się gangliozydów. Ich kumulacja prowadzi z czasem do stopniowego zaniku prawidłowych czynności układu nerwowego w wyniku czego może wystąpić m.in. niedorozwój umysłowy, zaburzenia motoryczne, ślepota, utrata mowy, agresywność. Szczególnie ciężki przebieg kliniczny mają tzw. choroby spichrzania, które związane są z wrodzonym niedoborem aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy, znane jako choroba Tay-Sachsa i choroba Sandhoffa. Mają one podłoże genetyczne i są schorzeniami nieuleczalnymi, powodującymi śmierć w dzieciństwie.

**Zasada metody oznaczania aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy**

Enzym HEX katalizuje hydrolizę wiązania β-glikozydowego między N-acetyloglukozoaminą a p-nitrofenolem w pH 4,7 buforu fosforanowo-cytrynianowego (Ryc. 1.). Dodanie buforu bora­nowe­go alkalizuje środowisko i przerywa reakcję. W środowisku alkalicznym uwolniony p-nitrofenol dysocjuje barwiąc się na żółto (Ryc.2.).



Ryc. 1.Hydroliza p-nitrofenylo-N-acetylo-β-D-glukozoaminidu przez HEX



Ryc. 2 . Dysocjacja p-nitrofenolu

**Zasada metody oznaczenia białka wg Lowry**

Białko z odczynnikiem Folina-Ciocalteau tworzy niebiesko-fioletowy kompleks. Kationy miedzi reagują z wiązaniami peptydowymi (reakcja biuretowa). Tyrozyna i tryptofan białka oraz kationy miedzi związane z białkiem redukują fosfomolibdenian do błękitu fosfomolibdenowego.

***Zagadnienia do przygotowania***

1. Budowa i właściwości N-acetylo-β-heksozoaminidazy.

2. Metody oznaczania aktywności enzymatycznej.

3. Sposoby wyrażania aktywności enzymatycznej.

4. Czynniki wpływające na aktywność enzymów.

5. Swoistość enzymów.

6. Sposoby kontroli i oceny poszczególnych etapów izolowania enzymów.

***Odczynniki:***

200 mM bufor boranowy (pH 9,8);

61g K2B4O7 x H20 rozpuścić w 800 ml wody dest. i doprowadzić do pH 9,8 pod kontrolą pehametru przy użyciu 200 mM KOH. Uzupełnić roztwór wodą dest. do objętości 1000 ml. Ponownie sprawdzić pH.

bufor fosforanowo-cytrynianowy wg Mc Ilvaine (pH 4,7);

2,5g kwasu cytrynowego rozpuścić w 120 ml H2O dest. Doprowadzić do pH 4,7 pod kontrolą pehametru 200mM roztworem fosforanu sodu (Na2HPO4). Ponownie sprawdzić pH.

p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozyd (substrat);

138 mg p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozydu rozpuścić w 60 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine o pH 4,7.

0,25 mM p-nitrofenol;

7 mg p-nitrofenolu rozpuścić w 200 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine (pH 4,7).

250 mM sacharoza;

85,6 g sacharozy rozpuścić w 100 ml wody.

odczynnik Folina-Ciocalteau;

rozcieńczyć wodą dest. w stosunku 1:2.

odczynnik miedziowy;

1 ml 0,5% CuSO4 x 5 H2O w 1% cytrynianie sodu rozcieńczyć 50 ml 2% Na2CO3 w 0,1 M NaOH.

wzorzec białka: 0,03% liofilizowana albumina wołowa

30 mg liofilizowanej albuminy wołowej rozpuścić w 100 ml wody.

**Na stołach laboratoryjnych znajdują się odczynniki przygotowane do pracy**

***Cel ćwiczenia:*** Oznaczenie aktywności specyficznej N-acetylo-β-heksozoaminidazy w róż­nych frakcjach podkomórkowych

***Wykonanie:***

1. Oznaczanie białka metodą Lowry

1.1. Wykres kalibracyjny albuminy wołowej

 Wzorzec albuminy należy rozcieńczyć wodą wg tabeli I. Następnie do każdej probówki dodać po 2 ml odczynnika miedziowego sporządzonego bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia. Po 10 minutach do mieszaniny dodać stale mieszając na wytrząsarce 0,2 ml odczynnika Folina-Ciocalteau. Próby odstawić na 30 minut w temperaturze pokojowej.

Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 750 nm. W zeszycie sporządzić tabelę I. Wpisać w odpowiedniej kolumnie w tabeli wartości ekstynkcji (E750) odczytane na spektrofotometrze.

**Tabela I.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próby | Objętość wzorca [ml] | Objętość H2O [ml] | Objętość odczynnika miedziowego [ml] | Objętość odczynnika Folina-Ciocalteau [ml] | Stężenie albuminy wołowej [g/ml] | Wartość E750 |
| 0 | - | 0,4 | 2 | 0,2 | 0 |  |
| 1 | 0,05 | 0,35 | 2 | 0,2 | 37,5 |  |
| 2 | 0,1 | 0,3 | 2 | 0,2 | 75,0 |  |
| 3 | 0,2 | 0,2 | 2 | 0,2 | 150,0 |  |
| 4 | 0,3 | 0,1 | 2 | 0,2 | 225,0 |  |
| 5 | 0,4 | - | 2 | 0,2 | 300,0 |  |

W zeszycie sporządzić wykres kalibracyjny dla albuminy wołowej na podstawie zmierzonych absorbancji (oś rzędnych) oraz stężenia albuminy w próbach (oś odciętych) – jak na Ryc.3.

Ryc.3. Przykładowy wykres kalibracyjny albuminy wołowej.

1.2. Oznaczenie stężenia białka w badanych próbach

Do 0,2 ml próby dodać 1 ml odczynnika miedziowego sporządzonego bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia. Po 10 minutach do mieszaniny dodać stale mieszając na wytrząsarce 0,1 ml odczynnika Folina-Ciocalteau. Próby odstawić na 30 minut w temperaturze pokojowej.

 Do próby kontrolnej oznaczonej „0” dodać 0,2 ml wody redestylowanej oraz 1 ml odczynnika miedziowego. Po 10 minutach do mieszaniny dodać stale mieszając na wytrząsarce 0,1 ml odczynnika Folina-Ciocalteau. Próby odstawić na 30 minut w temperaturze pokojowej.

Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 750 nm. Stężenie białka odczytać z wykresu kalibracyjnego sporządzonego przy użyciu liofilizowanej albuminy wołowej, a wartości wpisać do sporządzonej w zeszycie tabeli III.

2. Oznaczanie aktywności N-acetylo-β-heksozoaminidazy

2.1. Wykres kalibracyjny p-nitrofenolu (pNP)

Wzorzec p-nitrofenolu należy rozcieńczyć wodą wg tabeli II. Następnie do każdej probówki dodać po 1 ml buforu boranowego (pH 9,8). W zeszycie sporządzić Tab. II. Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 410 nm i wpisać w odpowiedniej kolumnie w tabeli jej wartości (E410).

**Tabela II.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próby | Objętośćwzorca[ml] | Objętośćwody[ml] | Objętość200 mMbuforuboranowego pH 9,8 [ml] | Ilość nmolip-nitrofenolu(pNP) w 1,4 mlpróby | Wartość E410 |
| 0 | - | 0,4 | 1,0 | 0 |  |
| 1 | 0,05 | 0,35 | 1,0 | 12,5 |  |
| 2 | 0,1 | 0,3 | 1,0 | 25 |  |
| 3 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 50 |  |
| 4 | 0,3 | 0,1 | 1,0 | 75 |  |
| 5 | 0,4 | - | 1,0 | 100 |  |

Na podstawie otrzymanych wartości ekstynkcji (oś rzędnych) oraz znanej ilości p-nitrofenolu (oś odciętych) wykreślić w zeszycie wykres kalibracyjny dla p-nitrofenolu – jak na Ryc.4.

Ryc. 4. Przykładowy wykres kalibracyjny dla pNP.

2.2. Oznaczanie aktywności enzymu

Do 0,15 ml roztworu substratu dodać 0,2 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine (pH 4,7) i 0,05 ml próby badanej. Do próby kontrolnej oznaczonej „0” dodać 0,15 ml roztworu substratu, 0,2 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine (pH 4,7) i 0,05 ml wody redest. Probówki inkubować przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Reakcję przerwać przez dodanie 1 ml 200 mM buforu boranowego (pH 9,8). Ekstynkcję uwolnionego p-nitrofenolu zmierzyć przy użyciu spektrofometru przy długości fali 410 nm. Ilość uwolnionego p-nitrofenolu odczytać z wykresu kalibracyjnego, a odczytane wartości wpisać do zeszytu w tabeli III.

**Tabela III.** Końcowe zestawienie wyników oznaczeń białka i N-acetylo-β-heksozoaminidazy we frakcjach podkomórkowych

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Frakcja | Objętość frakcji [ml] | **Białko** | **Enzym** |
| Rozcień-czenie | E750 białka | Stężenie białka w rozcieńczonej frakcji [µg/ml] (odczyt z wykresu kalibracyjnego albuminy) | Białko całkowite [μg/obj. frakcji] | Rozcień-czenie | E410 pNP | Odczyt z wykresu kalibracyjnego pNP[[1]](#footnote-1)\* | Aktywność całkowita [nKat/obj. frakcji] | Aktywność specyficzna [mKat/kg białka] |
| Homogenat |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Osad I(f. jądrowa) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Płyn nadosadowy I |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Osad II(f. mitochondrialno - lizosomalna) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Płyn nadosadowy II(f.cytoplazmatyczno-mikrosomalna) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Osad IIIA(bez Tritonu X-100) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Osad IIIB(z Tritonem X-100) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Płyn nadosadowy IIIA (bez Tritonu X-100) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Płyn nadosadowy IIIB (z Tritonem X-100) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

4. Przykład obliczeń

4.1. Przykład obliczeń aktywności enzymu we frakcji podkomórkowej

Ekstynkcja 1,4 ml próby rozcieńczonej 50 razy, odpowiedniej frakcji podkomórkowej zawierającej enzym, wynosi 0,550, co po odczytaniu z wykresu kalibracyjnego odpowiada 45 nmolom uwolnionego pNP (patrz Ryc. 5.)



Ryc.5.Przykład odczytu ilości uwolnionego pNP z wykresu kalibracyjnego.

Oznacza to, że enzym zawarty w 50 l tej frakcji podkomórkowej rozcieńczonej 50 razy uwalnia 45 nmoli pNP w czasie 30 minut (1800 s) inkubacji.

w 1 ml frakcji jest 20 razy więcej białka niż w 50 l

enzym zawarty w 1ml uwalnia 20 x 45 nmoli pNP w czasie 1800 s,

 czyli 900 nmoli pNP w czasie 1800 s,

czyli 0,5 nmola pNP w czasie 1 s

(0,5 nmola pNP/s) lub aktywnośći 0,5 nanokatala (0,5 nKat).

4.2. Obliczanie aktywności całkowitej

Aktywność enzymu zawartego w 1 ml nierozcieńczonej frakcji podkomórkowej wynosi:

50 (rozcieńczenie) × 0,5 nKat = 25 nKat/ml.

Jeżeli objętość frakcji podkomórkowej wynosi np. 40 ml, wtedy aktywność całkowita enzymu wynosi:

40 ml × 25 nKat = 1000 nKat.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Aktywność całkowita enzymu w poszczególnych frakcjach** |  | **ilość nmoli pNP uwolniona przez 50 μl frakcji podczas inkubacji** | **× 20 × rozcieńczenie** | **× objętość frakcji** |
| = | (odczyt z wykresu kalibracyjnego) |  |  |
|  |  | **czas inkubacji [s]** |

W naszym przykładzie:

 **45 nmoli × 20 × 50 × 40 ml**

 **Aktywność całkowita enzymu**

**w poszczególnych frakcjach = ­­ = 1000 nKat**

 **1800 s**

4.3. Obliczanie stężenia białka

 Jeżeli ekstynkcja mierzona przy długości fali 750 nm dla 100 × rozcieńczonej frakcji podkomórkowej wynosi np. 0,320, co po odczytaniu z wykresu kalibracyjnego dla albuminy odpowiada 94 μg/ml białka (ryc.6.),



Ryc.6. Przykład odczytu białka z wykresu kalibracyjnego.

Wtedy stężenie białka w nierozcieńczonej frakcji podkomórkowej wynosi:

100 × 94 μg/ml = 9400 μml = 9,4 mg/ml

Objętość frakcji wynosi 40 ml,

Czyli ilość białka całkowitego we frakcji 40 ml × 9,4 mg/ml = 376 mg.

 **Stężenie białka**

 **[g/ml] x rozcieńczenie x objętość**

(Odczyt z wykresu) **frakcji**

**Stężenie białka w poszczególnych frakcjach =**

 **1000** (zamiana g na mg)

W naszym przykładzie:

 **94 g x 100 x 40 ml**

 **Stężenie białka w poszczególnych frakcjach = ­­­­­­­­­­­ = 376 mg**

 **1000**

4.4. Obliczanie aktywności specyficznej (właściwej)

Jeżeli aktywność enzymu we frakcji podkomórkowej zawierającej 376 mg białka wynosi 1 μKat = 1000 nKat,

to 376 mg białka posiada 1000 nKat aktywności

376 g białka posiada 1000 μKat aktywności

**376 kg** białka posiada **1000 mKat** aktywności

**1 kg** białka posiada ***x*** **mKat** aktywności

*x* = **2,659 mKat/kg** białka

czyli aktywność enzymu wynosi 2,659 mKat/kg białka.

4.5. Obliczanie stopnia oczyszczania (na podstawie danych z tabeli III)

 **Aktywność specyficzna enzymu w poszczególnych frakcjach**

 **Stopień oczyszczania** =

 **Aktywność specyficzna enzymu w homogenacie**

4.6. Obliczanie wydajności (na podstawie danych z tabeli III)

 **Aktywność całkowita enzymu w poszczególnych frakcjach**

 **Wydajność** = x 100 %

 **Aktywność całkowita enzymu w homogenacie**

5. Wnioski oraz uwagi należy wpisać do zeszytu.

***Piśmiennictwo:***

1. Bańkowski (red.), (2008): Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, s. 37-64
2. Witwicki J., Ardelt W. (red.), (1989): Elementy enzymologii, PWN, Warszawa, s. 38-61, 230-234.
3. Stryer L., (2000): Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 198-213.
4. Zwierz K., Juszkiewicz J., Arciuch L., Gindzieński A., (1992): N-acetylo-β-heksozoami­nidaza-enzym chorób Tay- Sachsa i Sandhoffa., Postępy Biochemii, t.38, nr 3, s. 127-132.
5. Ostrowska L. Zwierz K., Koniusz Z., Gindzieński A., (1993): Rola, właściwości i znaczenie kliniczne N-acetylo-β-heksozoaminidazy., Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, t. 47, nr 1, s. 67-79.
6. Zwierz K., Arciuch L., Koniusz Z., Rostkowska K., (1994) Ćwiczenia z biochemii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego, Oficyna Wydawnicza Akademii Medycznej w Białymstoku, Białystok, s. 14-25

**Wyznaczanie zależności prędkości reakcji enzymatycznej od czasu inkubacji**

Niemal wszystkie reakcje chemiczne związane z funkcjonowaniem organizmów żywych, aby osiągnąć wystarczającą wydajność wymagają współudziału enzymów. Enzymy są wysoce specyficzne wobec substratów i dlatego dany enzym katalizuje zaledwie kilka reakcji spośród wielu możliwych dla danych substratów. W ten sposób enzymy umożliwiają prawidłowy przebieg procesów metabolicznych i biochemicznych.

Większość reakcji enzymatycznych zachodzi co najmniej milion razy szybciej niż ich niekatalizowane enzymatycznie odpowiedniki. Jednym z najszybciej działających znanych enzymów jest anhydraza węglanowa. Jedna jej cząsteczka potrafi w sprzyjających warunkach uwodnić od 104 do 106 cząsteczek dwutlenku węgla w czasie jednej sekundy. Podobnie do wszystkich katalizatorów enzymy nie zużywają się w trakcie przebiegu reakcji oraz nie wpływają na ich równowagę. Różnią się jednak od zwykłych katalizatorów tym, że przejawiają znacznie większą specyficzność substratową.

Znane są także biokatalizatory niebiałkowe. Należą do nich rybozymy, cząsteczki RNA o własnościach katalitycznych oraz deoksyrybozymy (DNAzymy) – fragmenty DNA zdolne do katalizowania pewnych reakcji. Enzymy niebiałkowe charakteryzują się mniejszą różnorodnością katalizowanych reakcji, jednak ich kinetyka i mechanika działania może być analizowana i klasyfikowana za pomocą metod stosowanych do enzymów białkowych.

Zazwyczaj cząsteczka białka enzymatycznego jest wielokrotnie większa (nawet o kilka rzędów wielkości) od cząsteczki substratu, co sugeruje istnienie centrum aktywnego – ograniczonego obszaru, które bezpośrednio wiąże substrat. Jedna z wcześniejszych teorii zakłada, że substrat pasuje do centrum aktywnego enzymu jak klucz do zamka (teoria Fishera). Koncepcja ta wyjaśnia specyficzność połączeń E-S, nie tłumaczy jednak dynamicznych zmian towarzyszących procesom katalitycznym.

Współcześnie dominuje, zaproponowany przez Koshlanda, model indukowanego dopasowania. Zakłada on, iż bliskość substratu indukuje zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu, wskutek czego może nastąpić połączenie pasujących do siebie powierzchni. Z chemicznego punktu widzenia polega to na przyjęciu odpowiedniej konformacji przez grupy funkcyjne cząsteczki enzymu, która umożliwia interakcję z cząsteczką substratu i właściwą katalizę. Reszty aminokwasów znajdujące się w miejscu katalitycznym mogą być od siebie znacznie oddalone w strukturze I-rzędowej, lecz przestrzennie zbliżone w strukturze III-rzędowej.

Miejsca aktywne są szczelinami bądź zagłębieniami w cząsteczce białka enzymatycznego zawierającymi grupy polarne. Miejsca te są zazwyczaj niedostępne dla cząsteczek wody, jeśli nie bierze ona udziału w reakcjach. Umiejscowienie grup polarnych jest biologicznie ważnym wyjątkiem od reguły, według której grupy polarne są eksponowane na zewnątrz cząsteczki do środowiska wodnego. W hydrofobowym środowisku skierowane do wnętrza szczeliny reszty aminokwasów polarnych nabierają właściwości niezbędnych do pełnienia funkcji katalitycznej.

***Zagadnienia do przygotowania***

1. Ogólna charakterystyka enzymów.

2. Budowa i funkcje enzymów.

3. Inaktywacja i stabilizacja enzymów.

***Odczynniki:***

200 mM bufor boranowy (pH 9,8);

61g K2B4O7 x H20 rozpuścić w 800 ml wody dest. i doprowadzić do pH 9,8 pod kontrolą pehametru przy użyciu 200 mM KOH. Uzupełnić roztwór wodą dest. do objętości 1000 ml. Ponownie sprawdzić pH.

bufor fosforanowo-cytrynianowy wg Mc Ilvaine (pH 4,7);

2,5g kwasu cytrynowego rozpuścić w 120 ml H2O dest. Doprowadzić do pH 4,7 pod kontrolą pehametru 200mM roztworem fosforanu sodu (Na2HPO4). Ponownie sprawdzić pH.

p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozyd (substrat);

138 mg p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozydu rozpuścić w 60 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine o pH 4,7.

0,25 mM p-nitrofenol;

7 mg p-nitrofenolu rozpuścić w 200 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine (pH 4,7).

250 mM sacharoza;

85,6 g sacharozy rozpuścić w 100 ml wody.

**Na stołach laboratoryjnych znajdują się odczynniki przygotowane do pracy**

***Cel ćwiczenia:*** Badanie zależności prędkości reakcji enzymatycznej od czasu inkubacji

**Wykonanie:**

**Prędkość reakcji enzymatycznej oznaczamy w homogenatach wątroby lub nerki**

1. Oznaczanie aktywności N-acetylo-β-heksozoaminidazy

1.1. Wykres kalibracyjny p-nitrofenolu (pNP)

Wzorzec p-nitrofenolu należy rozcieńczyć wodą wg tabeli I. Następnie do każdej probówki dodać po 1 ml buforu boranowego (pH 9,8). W zeszycie sporządzić tab. I. Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 410 nm i wpisać w odpowiedniej kolumnie w tabeli jej wartości (E410).

**Tabela I.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próby | ObjętośćWzorca [ml] | Objętośćwody [ml] | Objętość200 mMbuforuboranowego opH 9,8 [ml] | Ilość nmolip-nitrofenolu(pNP) w 1,4 mlpróby | Wartość E410 |
| 0 | - | 0,4 | 1,0 | 0 |  |
| 1 | 0,05 | 0,35 | 1,0 | 12,5 |  |
| 2 | 0,1 | 0,3 | 1,0 | 25 |  |
| 3 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 50 |  |
| 4 | 0,3 | 0,1 | 1,0 | 75 |  |
| 5 | 0,4 | - | 1,0 | 100 |  |

Na podstawie otrzymanej wartości ekstynkcji (oś rzędnych) oraz znanej ilości p-nitrofenolu (oś odciętych) wykreślić w zeszycie wykres kalibracyjny p-nitrofenolu – jak na Ryc.1.

Ryc. 1. Przykładowy wykres kalibracyjny dla pNP.

2. Inkubacja

Do oznaczeń prędkości reakcji enzymatycznej należy użyć 40 – krotnego rozcieńczenia homogenatu wątroby lub 200 – krotnego rozcieńczenia homogenatu nerki.

Do 6 probówek, oznakowanych od 0 do 5, odmierzyć po 150 µl substratu (p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozyd). Następnie do każdej probówki dodać po 200 µl buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7. Probówki wstawić na 5 minut do łaźni wodnej o temperaturze 37ºC. Następnie do każdej probówki dodać po 50 µl odpowiednio rozcieńczonej próby. Do probówki oznaczonej „0” dodać natychmiast 1 ml 0,2 M buforu boranowego (pH 9,8). Zawartość pozostałych probówek inkubować w łaźni o temperaturze 37ºC. Po 15 minutach inkubacji do probówek oznakowanych numerem „1” dodać po 1 ml buforu boranowego i co kolejne 15 minut do dalszych probówek oznakowanych kolejnymi numerami.

3. Oznaczenie uwolnionego pNP

 Na spektrofotometrze odczytać ekstynkcję wszystkich prób od 1 do 5 przy długości fali 410 nm w stosunku do próby kontrolnej (probówki oznakowanej jako „0”) i wpisać do odpowiedniej kolumny w tabeli II. Wartości stężeń powstałego pNP odczytać z wykresu kalibracyjnego dla pNP. Następnie obliczyć prędkość reakcji enzymatycznej, czyli ilość nmoli rozłożonego substratu w czasie 1 minuty. Wszystkie otrzymane dane wpisać do odpowiednich kolumn w tabeli II.

**Tabela II.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próby | Czasinkubacji (minuty) | Wartość E410 | ŚredniaWartość E410 | Ilość uwolnionego produktu(odczyt z wykresu kalibracyjnego pNP) | Prędkość reakcji enzymatycznej (ilość nmoli rozłożonego substratu w czasie 1 min) |
| 1 | 15 |  |  |  |  |
| 2 | 30 |  |  |  |  |
| 3 | 45 |  |  |  |  |
| 4 | 60 |  |  |  |  |
| 5 | 75 |  |  |  |  |

Sporządzić w zeszycie wykres zależności prędkości reakcji enzymatycznej (oś rzędnych) od czasu inkubacji (oś odciętych).

4. Wnioski oraz uwagi należy wpisać do zeszytu.

***Piśmiennictwo:***

1. Bańkowski (red.), (2008): Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, s. 37-64
2. Witwicki J., Ardelt W. (red.), (1989): Elementy enzymologii, PWN, Warszawa, s. 38-61, 230-234.
3. Stryer L., (2000): Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 198-213.
4. Zwierz K., Juszkiewicz J., Arciuch L., Gindzieński A., (1992): N-acetylo-β-heksozoami­nidaza-enzym chorób Tay- Sachsa i Sandhoffa., Postępy Biochemii, t.38, nr 3, s. 127-132.
5. Ostrowska L. Zwierz K., Koniusz Z., Gindzieński A., (1993): Rola, właściwości i znaczenie kliniczne N-acetylo-β-heksozoaminidazy., Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, t. 47, nr 1, s. 67-79.
6. Zwierz K., Arciuch L., Koniusz Z., Rostkowska K., (1994) Ćwiczenia z biochemii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego, Oficyna Wydawnicza Akademii Medycznej w Białymstoku, Białystok, s. 26-37

**Wyznaczanie zależności prędkości reakcji enzymatycznej od pH środowiska reakcji**

Prędkość reakcji enzymatycznej zależy od różnych czynników fizykochemicznych środowiska: temperatury, [pH](http://pl.wikipedia.org/wiki/Skala_pH), [stężenia](http://pl.wikipedia.org/wiki/Si%C5%82a_jonowa) substratu i innych. Każdy enzym wykazuje maksimum aktywności w pewnym optymalnym zakresie danego parametru. W zależności od enzymu, położenie [optimum](http://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Optimum&action=edit&redlink=1) może być różne, a jego zakres szerszy lub węższy. Także ogólny kształt wykresu zależności prędkości reakcji enzymatycznej danego enzymu od poszczególnych parametrów jest różny dla różnych enzymów, w zależności od ich pochodzenia, budowy itp.

Wpływ temperatury na działanie enzymów



Zależność aktywności enzymów od temperatury.

Szybkość reakcji enzymatycznych wzrasta wraz ze wzrostem temperatury, gdyż następuje wzrost [energii kinetycznej](http://pl.wikipedia.org/wiki/Energia_kinetyczna) cząstek i większa częstotliwość ich zderzeń. Wzrost prędkości reakcji w zależności od temperatury można opisać za pomocą współczynnika temperaturowego Q10, określającego jak zmienia się szybkość reakcji przy wzroście temperatury o 10 °C:



Po przekroczeniu optymalnej temperatury następuje gwałtowny spadek prędkości reakcji, co związane jest z denaturacją struktury enzymów. Wpływ temperatury na prędkość działania enzymów nie jest prostą zależnością. Prędkość reakcji enzymatycznej wzrasta tylko w takim zakresie temperatury, w którym enzym pozostaje stabilny. Dalszy wzrost temperatury powoduje denaturację termiczną enzymów. Z reguły wzrost temperatury o 10 °C podwaja prędkość reakcji w zakresie temperatur niedenaturujących struktury enzymu (Q10=2). Zatem parametr Q10 ma zastosowanie tylko w nie denaturującym zakresie temperatur i jest on charakterystyczny dla danego enzymu. Zależy on od energii aktywacji katalizowanej reakcji. W temperaturze optymalnej prędkość reakcji enzymatycznej jest największa. Na optymalną temperaturę reakcji enzymatycznej składają się dwa procesy: wzrost szybkości reakcji związany ze wzrostem energii kinetycznej oraz wzrost szybkości denaturacji termicznej enzymu powyżej krytycznej temperatury. Gdy drugi składnik zaczyna przeważać, następuje spadek prędkości. Optimum temperaturowe dla większości enzymów znajduje się w zakresie 30-45 °C. Powyżej tego zakresu następuje spadek prędkości, zaś w temperaturze powyżej 60 °C enzymy ulegają nieodwracalnej denaturacji.

Większość enzymów ulega powolnej denaturacji nawet w temperaturach optymalnych i niższych niż krytyczna. Zależy to od natury samego enzymu, stopnia jego oczyszczenia (w preparatach), a także od pH. Najwyższa temperatura, w której jeszcze nie zachodzi termiczna dezaktywacja enzymu w danych warunkach określana jest jako termostabilność enzymu.

Wpływ pH na działanie enzymów

Optimum pH, obok optimum temperaturowego, to drugi ważny parametr charakteryzujący prędkość reakcji enzymatycznej. Wpływ pH wiąże się z faktem, że enzymy jako białka posiadają wiele aminokwasów ulegających [jonizacji](http://pl.wikipedia.org/wiki/Jonizacja), a aminokwasy centrum aktywnego często mogą pełnić swoją rolę tylko w określonym stanie jonizacji. Jonizacja samych substratów oraz kompleksów ES również wpływa na prędkość reakcji enzymatycznej. Za przykład takiego zjawiska może służyć proces hydrolizy przeprowadzany przez [pepsynę](http://pl.wikipedia.org/wiki/Pepsyna). Optimum jej działania to pH 1,0-2,0. W tych warunkach cząsteczka pepsyny bogata jest w aminokwasy dikarboksylowe i jest jeszcze ujemnie naładowanym anionem. W takim samym środowisku większość białek ma ładunek dodatni. Od stopnia jonizacji pewnych grup zależy także ogólna [konformacja](http://pl.wikipedia.org/wiki/Konformacja) cząsteczki enzymu, zapewniająca mu optymalną prędkość reakcji, a w zbyt [kwaśnym](http://pl.wikipedia.org/wiki/Moc_kwasu) czy zbyt [zasadowym](http://pl.wikipedia.org/wiki/Moc_zasady) środowisku enzym ulegnie denaturacji.

Wykres zależności prędkości reakcji enzymatycznej od pH ma najczęściej kształt dzwonowaty. Oznacza to, iż enzym ma największą aktywność w swoim optymalnym pH, po czym prędkość reakcji spada wraz z oddalaniem się od tego punktu. Zależność prędkości reakcji enzymatycznej od pH bada się w warunkach stałej temperatury oraz przy maksymalnym wysyceniu enzymu substratem.

Wpływ stężenia substratu na prędkość reakcji enzymatycznej

Ruch enzymów w komórce jest na ogół bardzo wolny, bądź są one praktycznie nieruchome. To cząsteczki substratu w przestrzeni wewnątrzkomórkowej efektywnie penetrują przestrzeń zderzając się ze sobą oraz z cząsteczkami enzymu. Wzrost stężenia substratu zwiększa szanse enzymu na wytworzenie kompleksu enzym-substrat. Kompleks ten utrzymuje się do chwili, gdy substrat zostanie przekształcony w produkt lub gdy przypadkowe ruchy cieplne spowodują zwrotną dysocjację kompleksu na enzym i nieprzekształcony substrat. Enzym ma ograniczoną zdolność wiązania i przekształcania substratu. Po przekroczeniu stężenia, przy którym wszystkie miejsca aktywne enzymu zostaną wysycone substratem dalszy wzrost jego stężenia nie będzie wpływał na szybkość reakcji.

***Zagadnienia do przygotowania***

1. Ogólna charakterystyka enzymów.

2. Budowa i funkcje enzymów.

3. Inaktywacja i stabilizacja enzymów.

***Odczynniki:***

200 mM bufor boranowy (pH 9,8);

61g K2B4O7 x H20 rozpuścić w 800 ml wody dest. i doprowadzić do pH 9,8 pod kontrolą pehametru przy użyciu 200 mM KOH. Uzupełnić roztwór wodą dest. do objętości 1000 ml. Ponownie sprawdzić pH.

bufor fosforanowo-cytrynianowy wg Mc Ilvaine (pH 4,7);

2,5g kwasu cytrynowego rozpuścić w 120 ml H2O dest. Doprowadzić do pH 4,7 pod kontrolą pehametru 200mM roztworem fosforanu sodu (Na2HPO4). Ponownie sprawdzić pH.

p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozyd (substrat);

138 mg p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozydu rozpuścić w 60 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine o pH 4,7.

0,25 mM p-nitrofenol;

7 mg p-nitrofenolu rozpuścić w 200 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine (pH 4,7).

250 mM sacharoza;

85,6 g sacharozy rozpuścić w 100 ml wody.

**Na stołach laboratoryjnych znajdują się odczynniki przygotowane do pracy**

***Cel ćwiczenia:*** Badanie zależności prędkości reakcji enzymatycznej od pH środowiska reakcji

**Wykonanie:**

**Prędkość reakcji enzymatycznej oznaczamy w homogenatach wątroby lub nerki**

1. Oznaczanie aktywności N-acetylo-β-heksozoaminidazy

1.1. Wykres kalibracyjny p-nitrofenolu (pNP)

Wzorzec p-nitrofenolu należy rozcieńczyć wodą wg tabeli I. Następnie do każdej probówki dodać po 1 ml buforu boranowego (pH 9,8). Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 410 nm i wpisać w odpowiedniej kolumnie w tabeli jej wartości (E410).

Tabela I.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próby | Objętośćwzorca [ml] | Objętośćwody [ml] | Objętość200 mMbuforuboranowego opH 9,8 [ml] | Ilość nmolip-nitrofenolu(pNP) w 1,4 mlpróby | Wartość E410 |
| 0 | - | 0,4 | 1,0 | 0 |  |
| 1 | 0,05 | 0,35 | 1,0 | 12,5 |  |
| 2 | 0,1 | 0,3 | 1,0 | 25 |  |
| 3 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 50 |  |
| 4 | 0,3 | 0,1 | 1,0 | 75 |  |
| 5 | 0,4 | - | 1,0 | 100 |  |

Na podstawie otrzymanej wartości ekstynkcji (oś rzędnych) oraz znanej ilości p-nitrofenolu (oś odciętych) wykreślić w zeszycie wykres kalibracyjny p-nitrofenolu – jak na Ryc.1.

Ryc. 1. Przykładowy wykres kalibracyjny dla pNP.

2. Inkubacja

Do oznaczeń prędkości reakcji enzymatycznej należy użyć 40–krotnego rozcieńczenia homogenatu wątroby lub 200–krotnego rozcieńczenia homogenatu nerki.

Do probówek (oznakowanych od 0 do 5) dodać po 150 µl substratu oraz po 200 µl buforu fosforanowo-cytrynianowego o odpowiednim pH wg tabeli II. Następnie do tych probówek dodać po 50 µl odpowiednio rozcieńczonej próby i inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37ºC przez 30 minut. Po tym czasie do każdej probówki dodać 1 ml buforu boranowego (pH 9,8). Do probówki oznakowanej „0” odmierzyć 150 µl substratu, 200 µl buforu fosforanowo-cytrynianowego (pH 4,7) 1 ml buforu boranowego (pH 9,8) i 50 µl odpowiednio rozcieńczonej próby.

3. Oznaczenie uwolnionego pNP

 Na spektrofotometrze odczytać ekstynkcję wszystkich prób od 1 do 5 przy długości fali 410 nm w stosunku do próby kontrolnej (probówki oznakowanej jako „0”) i wpisać do odpowiedniej kolumny w tabeli II. Ilość uwolnionego produktu odczytać z wykresu kalibracyjnego dla pNP. Następnie obliczyć prędkość reakcji enzymatycznej, czyli ilość nmoli rozłożonego substratu w czasie 1 minuty. Wszystkie otrzymane dane wpisać do odpowiednich kolumn w tabeli II.

Tabela II.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nr próbek | pH buforu | Wartość E410 | Średniawartość E410 | Ilość uwolnionego produktu(odczyt z wykresu kalibracyjnego pNP) | Prędkość reakcji enzymatycznej (ilość nmoli rozłożonego substratu w czasie 1 min) |
| 1 | 3,5 |  |  |  |  |
| 2 | 4,0 |  |  |  |  |
| 3 | 4,5 |  |  |  |  |
| 4 | 5,0 |  |  |  |  |
| 5 | 5,5 |  |  |  |  |

Sporządzić w zeszycie wykres zależności prędkości reakcji enzymatycznej (oś rzędnych) od pH mieszaniny inkubacyjnej (oś odciętych).

4. Wnioski oraz uwagi należy wpisać do zeszytu.

***Piśmiennictwo:***

1. Bańkowski (red.), (2008): Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, s. 37-64
2. Witwicki J., Ardelt W. (red.), (1989): Elementy enzymologii, PWN, Warszawa, s. 38-61, 230-234.
3. Stryer L., (2000): Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 198-213.
4. Zwierz K., Juszkiewicz J., Arciuch L., Gindzieński A., (1992): N-acetylo-β-heksozoami­nidaza-enzym chorób Tay- Sachsa i Sandhoffa., Postępy Biochemii, t.38, nr 3, s. 127-132.
5. Ostrowska L. Zwierz K., Koniusz Z., Gindzieński A., (1993): Rola, właściwości i znaczenie kliniczne N-acetylo-β-heksozoaminidazy., Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, t. 47, nr 1, s. 67-79.
6. Zwierz K., Arciuch L., Koniusz Z., Rostkowska K., (1994) Ćwiczenia z biochemii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego, Oficyna Wydawnicza Akademii Medycznej w Białymstoku, Białystok, s. 26-37
1. \* Ilość nmoli pNP uwolnionego przez enzym zawarty w 50 l rozcieńczonej frakcji podkomórkowej w czasie 30 min. inkubacji. [↑](#footnote-ref-1)