**Izoenzymy N-acetylo-β-heksozoaminidazy**

N-acetylo-β-D-heksozoaminidaza (HEX) (E.C.3.2.1.52) jest kwaśną egzoglikozydazą lizosomalną odszczepiającą reszty N-acetyloglukozoaminy (GlcNAc) lub N-acetylogalaktozoaminy (GalNAc) z nieredukującego końca łańcuchów oligosacharydowych glikokoniugatów. HEX jest glikoproteiną zbudowaną z łańcuchów polipeptydowych α i β. Łańcuchy te występują parami, w trzech możliwych kombinacjach. Wyróżnia się, zatem trzy izoenzymy HEX: izoenzym A-αβ, izoenzym B-ββ oraz izoenzym S-αα. U człowieka geny kodujące syntezę N-acetylo-β–heskozoaminidazy są zlokalizowane na dwóch różnych parach chromosomów-łańcuch α na chromosomie 15 pary a łańcuch β na chromosomie 5 pary.

Masa molowa izoenzym A waha się w granicach 96-110 kD. Jest on umiarkowanie wrażliwy na ogrzewanie i ulega inaktywacji po trzygodzinnym ogrzewaniu w 50oC w pH 5,0 lub przez pięć minut w 60o oraz podczas inkubacji w 37ow pH 2,8 przez 5 minut. HEX A przeważa w surowicy krwi, moczu, płynie stawowym.

Izoenzym B o masie molowej 110-112 kD jest termostabilny. Występuje w największych ilościach w wątrobie łożysku i nerkach.

Wrażliwość obu form na temperaturę jest przydatna w ich różnicowaniu. Inkubacja przez 5 minut w 60oC a także w 37oC w pH 2,8 inaktywuje tylko izoenzym A, nie wpływając na aktywność pozostałych form.

Aktywność HEX stwierdzono: nerce, wątrobie, błonie śluzowej żołądka i jelit, łożysku. W naturalnych oligosacharydach HEX hydrolizuje wiązania β-glikozydowe N-acetyloheksozoamin z innymi cukrami. Enzym ten również działa na drobnocząsteczkowe sztuczne substraty, takie jak pochodne p-nitrofenolu i metyloumbelliferonu.

### Zasada metody

N-acetylo-β-D–heskozoaminidaza katalizuje hydrolizę wiązania β -glikozydowego pomiędzy N-acetyloglukozoaminą a 4-metyloumbeliferonem. Uwolniony 4- metyloumbeliferon fluoryzuje w środowisku zasadowym po naświetleniu lampą *UV* Ryc.1



**Ryc.1** Hydroliza 4-umbelliferylo-N-acetylo-β-glukozoamidu przez N-acetylo-β–heksozoaminidazę

#### Zagadnienia do przygotowania

1. Definicja i znaczenie biologiczne izoenzymów
2. Budowa N-acetylo-β–heksozoaminidazy
3. Metody wykrywania i oznaczania izoenzymów N-acetylo-β–heksozoaminidazy

#### Materiał i odczynniki

1. tkanka (nerka, wątroba)
2. bufor elektrodowy ( 50mM bufor fosforanowy o pH 6,0 );
3. bufor fosforanowo-cytrynianowy wg Mc Ilvaine o pH 2,5;
4. bufor fosforanowo-cytrynianowy wg Mc Ilvaine o pH 5,0;
5. bufor fosforanowo-cytrynianowy wg Mc Ilvaine o pH 5,5;
6. substrat I (0,02% roztwór 4-metylo-umbelliferylo-N-acetylo-β-glukozaminidu w buforze fosforanowo-cytrynianowym wg Mc Ilvaine o pH 4,0 );
7. 30% metanol;
8. substrat II (p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy-β-D-glukopiranozyd w buforze fosforanowo-cytrynianowym wg Mc Ilvaine o pH 4,7;
9. bufor fosforanowo-cytrynianowy wg Mc Ilvaine o pH 4,7;
10. 200 mM bufor boranowy o pH 9,8.

#### Cel ćwiczenia Rozdział izoenzymów N-acetylo-β-heksozoaminidazy A i B na octanie celulozy.

Wykazanie wpływu podwyższonej temperatury i obniżenia pH na stabilność izoenzymów N-acetylo-β-heksozoaminidazy A i B.

## ***Wykonanie***

1. Przygotowanie homogenatów tkankowych do rozdziału elektroforetycznego

1.1 Przygotowanie homogenatów w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5:

1. Odważyć 500 mg tkanki, np. (nerki lub wątroby)
2. Dodać 4,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine o pH 5,5.
3. Tkankę zhomogenizować homogenizatorem nożowym przez 2 minuty.
4. Homogenat odwirować przy 10.000 x *g* w ciągu 20 minut (12.000 obrotów/minutę, wirówka MPW 365)
5. Płyn nadosadowy zachować do rozdziału elektroforetycznego.

1.2 Przygotowanie homogenatów w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,0:

1. Odważyć 500 mg tkanki np. (nerki lub wątroby
2. Dodać 4,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine o pH 5,0.
3. Tkankę zhomogenizować homogenizatorem nożowym przez 2 minuty.
4. Homogenat odwirować przy 10.000 x *g* przez 20 minut (12.000 obrotów/minutę, wirówka MPW 365 )
5. Płyn nadosadowy preinkubować w łaźni o temperaturze 60oC przez 20 minut.

1.3 Przygotowanie homogenatów w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 2,5:

1. Odważyć 500 mg tkanki np. (nerki lub wątroby)
2. Dodać 4,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mc Ilvaine o pH 2,5.
3. Tkankę zhomogenizować homogenizatorem nożowym przez 2 minuty.
4. Homogenat odwirować przy 10.000 x *g* przez 20 minut (12.000 obrotów/minutę, wirówka MPW 365)
5. Płyn nadosadowy preinkubować w łaźni o temperaturze 37oC przez 5 minut.

2.Przygotowanie pasków z octanu celulozy

1. Przygotować trzy paski z octanu celulozy o wymiarach 120x25 mm
2. Narysować zwykłym ołówkiem linię startu w odległości 4 cm od krótkiego boku
3. Zaznaczyć (+) koniec anodowy i (-) koniec katodowy.
4. Paski wymoczone przez dobę w 30% metanolu, wypłukać dwa razy wodą destylowaną i umieścić w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,0 na 15-30 minut.
5. Przed umieszczeniem paska w aparacie do elektroforezy należy usunąć nadmiar buforu bibułą filtracyjną

3. Rozdział elektroforetyczny

1. Rozdział przeprowadzić w aparacie do elektroforezy poziomej (Ryc. 2).



**Ryc.2.** Schemat aparatu do elektroforezy białek na octanie celulozy

1. Po starannym umyciu aparatu napełnić kawałkami lodu dolną część.
2. Napełnić 50 mM buforem fosforanowym o pH 6.0 komory elektrodowe dolnej części aparatu.
3. Zawiesić 3 paski z octanu celulozy tak, aby oba brzegi każdego paska były umieszczone w komorach wypełnionych 50 mM buforem fosforanowym o pH 6,0.
4. Przeprowadzić preelektroforezę od katoty (-) do anody (+) przy natężeniu prądu 20 mA napięcie 200V przez ok. 5 minut.
5. Nanieść przygotowane homogenaty w buforach o pH 5,5; 5,0 i 2,5 każdy na oddzielny pasek octanu celulozy przy pomocy pipety w ilości 10 μl w miejscu uprzednio narysowanej linii startowej.
6. Właściwą elektroforezę prowadzić przez 2,5 godziny przy napięciu 200V i natężeniu prądu 20 mA.
7. Po zakończonej elektroforezie należy wyłączyć zasilacz aparatu do elektroforezy, a z paskami z octanu celulozy zawierającymi elektroforogramy należy postąpić jak opisano poniżej.
8. Z aparatu do elektroforezy wodę z roztopionego lodu i bufor fosforanowy należy wylać do zlewu, a aparat starannie umyć.

4. Wykrywanie izoenzymów

4.1. Sporządzenie substratu I:

1. Substrat I przygotować bezpośrednio przed użyciem
2. 2 mg 4-metylo-umbeliferylo-N-acetylo-β-glukozoaminidazu (substrat I) rozpuścić w 10 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego wg Mv Ilvaine o pH 4,0.

4.2.Przeprowadzenie reakcji barwnej N-acetylo-β-heksozoaminidazy na elektroforogramach:

1. Na płytce szklanej (ryc. 3.) umieścić paski z bibuły filtracyjnej *Whatman 1*
2. Nasączyć je przygotowanym bezpośrednio przed użyciem roztworem substratu I (4-metylo-umbeliferylo-N-acetylo-β-glukozaminidazu w buforze fosforanowo-cytrynianowym wg Mc Ilvaine o pH 4,0).
3. Paski octanu celulozy z materiałem badanym po elektroforezie ułożyć na paskach bibuły nasączonych substratem
4. Przykryć drugą płytą szklaną, zawinąć w wilgotną ligninę i folię (Ryc. 3.)
5. Umieścić w cieplarce o temperaturze 37oC na ok. 30 minut.
6. Wyniki odczytać umieszczając płytkę szklaną z elektroforogramami pod lampą ultrafioletową.



**Ryc.3** Sposób uwidaczniania izoenzymów N-acetylo-β-heksozoaminidazy A i B po elektroforezie na paskach octanu celulozy.

5. Przechowywanie pasków z octanu celulozy

1. Po odczytaniu wyników, paski z octanu celulozy przemyć dwukrotnie wodą destylowaną
2. Umieścić w naczyniu wypełnionym 30% metanolem.

6. Oznaczanie aktywności N-acetylo-β-heksozoaminidazy

1. Do 4 probówek oznaczonych 0, 1, 2, 3, odmierzyć po 150 μl substratu II (p-nitrofenylo-2-acetamido-2deoksy-β-D-glukopiranozydu w buforze fosforanowo-cytrynianowym wg Mc Ilvaine o pH 4,7).
2. Do probówki oznaczonej 0 dodać 50 μl wody redestylowanej
3. Do probówki oznaczonej 1 dodać 50 μl wyciągu enzymatycznego sporządzonego wg przepisu w punkcie 1.1
4. Do probówki oznaczonej 2 dodać 50 μl wyciągu enzymatycznego sporządzonego wg przepisu w punkcie 1.2
5. Do probówki oznaczonej 3 dodać 50 μl wyciągu enzymatycznego sporządzonego wg przepisu w punkcie 1.3
6. Wyciąg enzymatyczny należy przed dodaniem do mieszanin inkubacyjnych odpowiednio rozcieńczyć buforem fosforanowo-cytrynianowym o pH 4,7
	* 1. wyciąg z wątroby 100x
		2. wyciąg z nerki 200x
7. Do wszystkich probówek dodać 200 μl buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7
8. Zawartość probówek wymieszać i inkubować przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37oC.
9. Po tym czasie próby wyjąć z łaźni i oziębić.
10. Dodać do każdej probówki po 1000 μl 200 mM buforu boranowego o pH 9,8.
11. Ekstynkcje uwolnionego p-nitrofenolu zmierzyć spektrofotometrycznie wobec próby 0 przy długości fali 410 nm
12. Wpisać wartości ekstynkcji do zeszytu w tabeli I

**Tabela 1.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Nr próby** | **Rodzaj Próby** | **Wartość E410** | **Liczba i jakość prążków po elektroforezie na octanie celulozy** |
| 1 | Płyn nadosadowy w buforze fosforanowo-cytrynianowymo pH 5,5 |  |  |
| 2 | Płyn nadosadowy w buforze fosforanowo-cytrynianowymo pH 5,0 po inkubacji w 60oC przez 30 minut |  |  |
| 3 | Płyn nadosadowy w buforze fosforanowo-cytrynianowymo pH 2,5 po inkubacji w 37oC przez 25 minut |  |  |

***Piśmiennictwo***

1. 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.
2. Zwierz K. (red), (1994): Ćwiczenia z Biochemii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego Wydawnictwo Uczelniane Akademia Medyczna Białystok
3. 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.