

ZAGADNIENIA DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII DLA STUDENTÓW II ROKU BIOTECHNOLOGII MEDYCZNEJ I st.

Ćwiczenie 5. WPŁYW STĘŻENIA SUBSTRATU I ENZYMU NA SZYBKOŚĆ REAKCJI KATALIZOWANEJ PRZEZ FOSFATAZĘ KWAŚNĄ

Teoretyczne przygotowanie do zajęć laboratoryjnych według poniższych zagadnień umożliwia podręcznik: **SKRYPT DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z BIOCHEMII** pod redakcją prof. Ludmiły Węglarz.

Część teoretyczna: rozdział 4 – ENZYMY.

Zagadnienia:

1. Podstawowe definicje związane z aktywnością enzymów.
2. Funkcja i specyficzność substratowa fosfatazy kwaśnej.
3. Sposoby pomiaru aktywności enzymatycznej.
4. Wpływ zmian pH, oraz mechanizm działania jonów wodorowych na aktywność fosfatazy kwaśnej.
5. Kinetyka reakcji enzymatycznej.
6. Wpływ czynników fizycznych na aktywność enzymów.

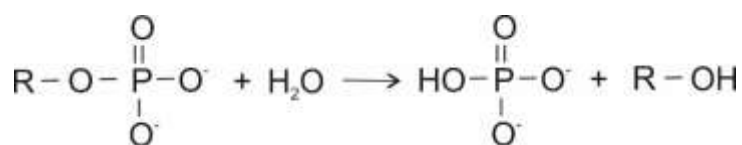
Cel ćwiczenia: badanie kinetyki reakcji katalizowanej przez fosfatazę kwaśną

Wprowadzenie:

Fosfatazy należą do enzymów z klasy hydrolaz, podklasy esteraz, katalizują hydrolizę wiązania estrowego różnych estrów fosforanowych.. Najbardziej rozpowszechnione są wśród nich hydrolazy monoestrów fosforanowych, dla których naturalnymi substratami są: estry fosforanowe cukrów (glukoza-6-fosforan, fruktozo-1,6- bisfosforan) glicerolofosforan, fosfoseryna itp.

Fosfatazy uczestniczą w procesach trawiennych, jak i związanych z modyfikacjami kowalencyjnymi białek. W komórce ssaków jest ponad 5 tysięcy ufosforylowanych białek i kilkaset fosfataz, które odpowiadają za ich defosforylację. W skrócie można powiedzieć, że fosfatazy białkowe odwracają efekty działania kinaz, katalizując odłączenie reszty fosforanowej od białka. Mechanizm odwracalnej modyfikacji kowalencyjnej w postaci fosforylacji i defosforylacji z powodu prostoty zachodzenia jest jednym najczęściej występujących sposobów regulacji białek enzymatycznych. Zmiana własności funkcjonowania enzymu zachodzi tylko w określonych fizjologicznie sytuacjach i wynika z odpowiedzi na zmieniające się warunki funkcjonowania komórki. Specyficzne własności grupy fosforanowej, których odłączenie katalizują fosfatazy, czyli ładunek ujemny w fizjologicznej wartości pH i zdolność do tworzenia wiązań jonowych z resztami argininy powodują, że właśnie ona jest wykorzystywana do zmiany struktury III-rzędowej białka, a tym samym do zmiany jego aktywności enzymatycznej. Warto zaznaczyć, że defosforylacja enzymów może powodować wzrost, a u innych białek, zmniejszenie aktywności enzymatycznej, nie istnieje tutaj ściśle określona reguła.

Fosfomonoesterazy katalizują reakcję odszczepienia pojedynczej reszty fosforanowej od substratu:



Fosfatazy wykazują niską specyficzność substratową, zależnie od optimum pH dla ich działania dzielone są na: *fosfatazy kwaśne* o optimum w pH ok. 5 i *fosfatazy alkaliczne* o optimum w pH ok. 9. Ich aktywność można oznaczyć wykorzystując ten sam substrat, przy zmianie wartości pH przeprowadzanej reakcji.

U człowieka fosfataza alkaliczna występuje przede wszystkim w osteoblastach kości, wątrobie, w błonie śluzowej jelita, w nerkach i w łożysku. W praktyce klinicznej oznacza się izoenzymy pochodzące z osteoblastów i hepatocytów. Wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej obserwuje się w chorobach kości (np. w krzywicy, chorobach nowotworowych kości), w nadczynności przytarczyc, żółtaczce zastoinowej i polekowym uszkodzeniu wątroby. Wzmożona aktywność fosfatazy zasadowej w surowicy niekoniecznie świadczy o procesach patologicznych - ma ona miejsce także podczas ciąży. Natomiast u pacjentów z niedoczynnością tarczycy i u dzieci z opóźnieniem wzrostu, aktywność tego enzymu jest wyraźnie obniżona.

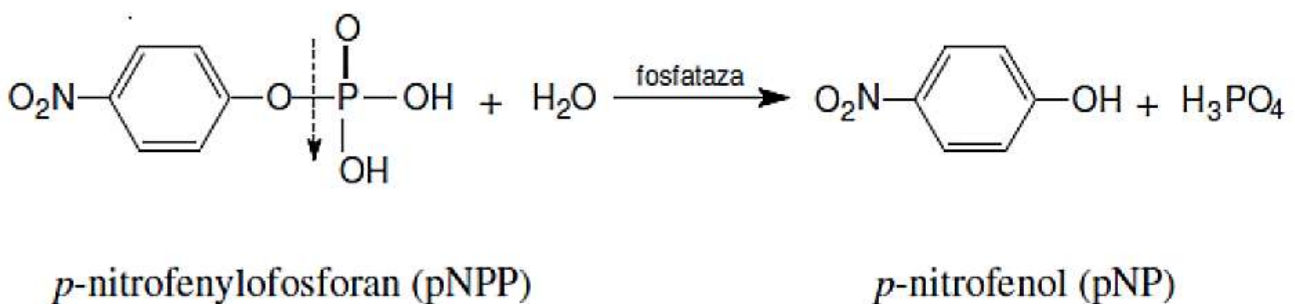
Fosfataza kwaśna (EC 3.1.3.2) występuje w dużych stężeniach w nasionach roślin, a u człowieka w gruczole krokowym, krwinkach czerwonych, płytkach krwi, komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby i śledziony, oraz w nerkach. Aktywność jej bardzo silnie wzrasta w chorobie nowotworowej prostaty i jest wykorzystywane do monitorowania procesu leczenia raka gruczołu sterczowego, Wzrost aktywności tego enzymu można także zaobserwować w guzach złośliwych kości oraz w chorobach nerek i wątroby.

W nasionach roślin aktywność fosfatazy kwaśnej silnie wzrasta podczas kiełkowania, a następnie maleje w miarę wzrostu siewek. Prawdopodobnie wzrost jej aktywności związany jest z uwalnianiem fosforanu nieorganicznego z organicznych form zapasowych fosforanu, np. z kwasu fitynowego. Aktywność fosfataz oznacza się zazwyczaj używając sztucznych substratów, takich jak: 2-glicerofosforan, fenylofosforan, fosforan fenoloftaleiny, p-nitrofenylofosforan.

Aktywność enzymu mierzy się ilością uwolnionego fosforanu lub części organicznej estru po inkubacji enzymu z substratem w ściśle określonych warunkach. Szczególnie przydatny jako substrat jest p-nitrofenylofosforan, gdyż jeden z produktów reakcji przechodzi w formę barwną już po zalkalizowaniu środowiska.

Zasada metody:

W ćwiczeniu wykorzystany zostanie wodny wyciąg białek enzymatycznych zawierających fosfatazę kwaśną z ziemniaka. Jako substrat będzie użyty p-nitrofenylofosforan. Reakcję hydrolizy tego związku z udziałem fosfatazy i tworzenie barwnego produktu pokazano na rysunku poniżej. Powstający produkt reakcji - p-nitrofenol - przyjmuje w środowisku zasadowym barwę żółtą i jej natężenie jest miarą aktywności fosfatazy.



Oznaczanie aktywności opiera się na pomiarze ilości uwolnionego pod wpływem enzymu p-nitrofenolu. Stężenie p-nitrofenolu oznacza się kolorymetrycznie.

Odczynniki:

1. 0,1 M bufor octanowy, pH 5,2;
2. Roztwór pNP (produkt) o stężeniu 0,5 mM
3. 10 mM roztwór pNPP (substrat)
4. 0,1 M roztwór NaOH
5. Roztwór fosfatazy kwaśnej.

Wykonanie krzywej standardowej dla pNP:

1. Do kolejnych 6 probówek odmierzyć podane w tabeli objętości 0,5 mM roztworu pNP i uzupełnić 0,1 M buforem octanowym o pH 5,2 do końcowej objętości 2 ml;

Nr próby	pNP [ml]	Bufor [ml]
0 (ślepa)	-	2
1	0,2	1,8
2	0,4	1,6
3	0,6	1,4
4	0,8	1,2
5	1,0	1,0

2. Do wszystkich probówek dodać po 5 ml 0,1 M NaOH i dokładnie wymieszać;
3. Odczytać absorbancję przy długości fali 420 nm wobec próby odczynnikowej (ślepej);
4. Z uzyskanych wyników wykreślić krzywą standardową (zależności A_{420} od ilości μmol pNP w próbce);

Przygotowanie roztworu fosfatazy kwaśnej

Odważyć 10-cio gramową porcję obranej bulwy z ziemniaka, zetrzeć na tarce i dodać 20 ml 0,1 M buforu octanowego o pH 5,2.

Homogenat przenieść ilościowo na gazę wyłożoną na lejku i przecedzić do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do kreski buforem octanowym, przelewając go porcjami przez gazę, dokładnie wymieszać. Dalsze rozcieńczenie przygotować przez przeniesienie 10 ml rozcieńczonego roztworu z kolby (100 ml) do kolby miarowej na 25 ml i dopełnić do kreski buforem octanowym, dokładnie wymieszać. Tak rozcieńczony ekstrakt enzymatyczny wykorzystywać do oznaczeń aktywności fosfatazy kwaśnej.

Oznaczenie aktywności fosfataz kwaśnej:

1. Przygotować 3 probówki (2 badane, i jedną odnośnikową);
2. Do prób badanych dodać po 0,5 ml enzymu;
3. Do próby odnośnikowej (odczynnikowej) dodać 0,5 ml 0,1 M buforu octanowego;
4. Do niezależnej probówki dodać 1,5 ml substratu (10 mM roztwór pNPP w buforze octanowym);
5. Wszystkie 4 probówki (2 badane, odnośnikowa i substrat) inkubować przez 5 min. w łaźni wodnej o temp. 37°C;
6. Rozpocząć reakcję enzymatyczną dodając do próby odnośnikowej i do prób badanych po 0,5 ml ogrzanego substratu, kontynuując inkubację;
7. Dokładnie po 10 min. od zmieszania reagentów, reakcję przerwać przez dodanie do wszystkich probówek po 5 ml 0,1 M NaOH;
8. Odczytać absorbancję przy długości fali 420 nm prób badanych wobec próby odnośnikowej;

9. Z krzywej standardowej odczytać ilość μmol pNP uwolnionego w czasie reakcji.

Przyrost ilości produktu w czasie:

1. Do 7 probówek (6 prób badanych i 1 próba odnośnikowa) dodać po 0,5 ml roztworu enzymu;
2. Rozpocząć reakcję enzymatyczną dodając kolejno do **prób badanych** po 0,5 ml substratu, całość wymieszać. Zanotować czas. Reakcję prowadzić w temperaturze pokojowej.
3. Reakcję przerwać dodając po 5 ml 0,1 M NaOH
 - Do probówki nr 1 po 2 min.
 - Do probówki nr 2 po 4 min.
 - Do probówki nr 3 po 6 min.
 - Do probówki nr 4 po 8 min.
 - Do probówki nr 5 po 10 min.
 - Do probówki nr 6 po 12 min.
4. Do próby odnośnikowej najpierw dodać 5 ml 0,1 M NaOH, a następnie 0,5 ml roztworu substratu;
5. Odczytać absorbancję przy długości fali 420 nm prób badanych wobec próby odnośnikowej;
6. Z krzywej standardowej odczytać ilość pNP uwolnionego w czasie reakcji dla każdej z prób;
7. Wykreślić zależność ilości uwalnianych μmol pNP od czasu reakcji.

Wpływ stężenia fosfatazy kwaśnej na szybkość reakcji enzymatycznej

1. Do 6 probówek odmierzyć następujące objętości enzymu: 0 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl , 500 μl i uzupełnić 0,1 M buforem octanowym o pH 5,2 do końcowej objętości 0,5 ml, zgodnie z podaną niżej tabelą;

Nr próby	Objętość enzymu [μl]	Bufor [μl]
0 (odczynnikowa)	-	500
1	50	450
2	100	400
3	200	300
4	300	200
5	400	100

2. Do osobnej probówki wprowadzić roztwór substratu w objętości 3,0 ml
3. Próby badane wraz z odnośnikową, oraz roztwór substratu wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C i inkubować przez 5 min;
4. Do serii prób badanych dodać po 0,5 ml substratu i reakcję kontynuować w temp. 37°C przez 10 min;
5. Dokładnie po 10 min. reakcję przerwać przez dodanie do prób badanych i do próby odnośnikowej 5 ml 0,1 M NaOH
6. Odczytać absorbancję przy długości fali 420 nm prób badanych wobec próby odnośnikowej;
7. Z krzywej standardowej odczytać ilość μmol pNP uwolnionego w czasie reakcji.
8. Uzupełnić tabelę pomiarów, wykres i wniosek w sprawozdaniu.