

ĆWICZENIA Z BIOCHEMII

dla studentów Wydziału Lekarskiego
i Wydziału Nauk o Zdrowiu
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku



pod redakcją

Prof. dr hab. Edwarda Bańkowskiego











**M. Cechowska-Pasko, Z. Galewska, T. Gogiel,
L. Romanowicz, K. Sobolewski, M. Wolańska**

Białystok 2017

Spis treści

	str.
1. Symbole i wzory znaków ostrzegawczych	4
2. Regulamin pracowni	5
3. Aminokwasy i białka	7
4. Właściwości białek w roztworach	13
5. Białka krwi	19
6. Kwasy nukleinowe	27
7. Węglowodany	33
8. Fosfolipidy, steroidy i witaminy rozpuszczalne w tłuszczach	39
9. Enzymy	45
10. Enzymy przewodu pokarmowego	51
11. Prędkość maksymalna reakcji enzymatycznej i stała Michaelisa	57
12. Aktywność enzymatyczna	63
13. Inhibicja kompetycyjna i niekompetycyjna	67
14. Aktywność aldolazy fruktozo-1,6-bis-fosforanowej	73
15. Oksydacyjna dekarboksylacja pirogronianu	77
16. Glutaminaza	83
17. Zużycie glukozy w mózgu	89
18. Synteza i rozpad glikogenu	95
19. Synteza i rozpad skrobi	103
20. Katalaza	107
21. Filtracja żelowa	111
22. Azot białkowy, transaminacja aminokwasów	117
23. Obliczenia biochemiczne	127

Znaki i symbole ostrzegawcze umieszczane na odczynnikach chemicznych

Znak	Symbol	Opis
	T+	Substancja bardzo toksyczna
	T	Substancja toksyczna
	Xn	Substancja szkodliwa
	C	Substancja żrąca
	Xi	Substancja drażniąca
	N	Substancja niebezpieczna dla środowiska
	E	Substancja wybuchowa
	O	Substancja utleniająca
	F+	Substancja skrajnie łatwopalna
	F	Substancja wysoce łatwopalna

Regulamin pracowni

1. Przed wejściem do pracowni należy nałożyć fartuch ochronny i miękkie obuwie.
2. W sali ćwiczeń należy pracować dokładnie, unikać zbędnych rozmów i zachowywać czystość miejsca pracy.
3. Należy zapoznać się ze znakami ostrzegawczymi i ich symbolami, umieszczonymi na odczynnikach przygotowywanych do ćwiczeń.
4. Preparatów i odczynników nie wolno badać smakiem.
5. W pracowni nie wolno spożywać pokarmów i napoi.
6. Obowiązuje oszczędne użytkowanie wody destylowanej, prądu elektrycznego i gazu.
7. Zaleca się szczególną ostrożność przy posługiwaniu się stężonymi kwasami, zasadami, trucznymi oraz płynami łatwopalnymi. Stężone kwasy, zasady oraz trucizny należy pobierać wyłącznie przez zanurzenie pipety. Zużyte kwasy, zasady należy wylewać do zlewu w ten sposób, aby uniknąć poparzenia przez odbite od ścianek zlewu kropelki płynu (trzymać ujęcie naczynia podczas wylewania możliwie jak najbliżej odpływu w zlewie, delikatnie spłukać wodą).

Płynami łatwopalnymi należy posługiwać się w pomieszczeniach bez zapalonych palników i innych źródeł otwartego ognia. Przechowywać je w naczyniach szczelnie zamkniętych.
8. Należy umiejętnie korzystać z instalacji gazowej. Przy zapalaniu palnika gazowego należy najpierw zamknąć dopływ powietrza, a następnie zbliżyć zapaloną zapałkę do wylotu kominka i powoli otworzyć kurek gazowy. Uregulować dopływ powietrza (płomień nie powinien huczeć ani kopcić). Niepotrzebne palniki należy natychmiast zgasić.

9. Przy ogrzewaniu płynów w probówkach, bezpośrednio nad płomieniem palnika, należy napełniać je jedynie do 1/4 objętości. Podczas ogrzewania ustawicznie potrząsać probówką. Wylot probówki należy kierować w stronę, gdzie nikogo nie ma. Ogrzewać górną powierzchnię płynu.
10. W przypadku poparzenia skóry, jamy ustnej lub oczu należy natychmiast zmyć żrący płyn obficie wodą wodociągową oraz zawiadomić asystenta. Następnie zobojętnić kwasy 5% wodorowęglanem sodu, a zasady - 1% kwasem octowym. Związki służące do zobojętniania są na każdej sali ćwiczeń.

Przed przystąpieniem do ćwiczeń należy sprawdzić, czy wyżej wymienione odczynniki znajdują się na sali.

11. W razie zapalenia się mieszaniny reakcyjnej, stołu lub fartucha ochronnego studenta, należy natychmiast gasić pożar przy użyciu koca szklanego (wisi na ścianie w sali) lub gaśnicy (znajduje się na sali) oraz zawiadomić asystenta.
12. Przed wyjściem z pracowni należy uporządkować miejsce pracy, odczynniki i sprzęt. Umyć szkło laboratoryjne. Zamknąć kurki gazowe, zakręcić krany.

Uwaga

Zabrania się wpisywania wyników i robienia notatek w skryptach. Uwagi dotyczące ćwiczeń, protokoły doświadczeń, interpretację wyników należy wpisywać do zeszytu, przeznaczonego do ćwiczeń z biochemii.

Aminokwasy i białka

Cel ćwiczenia: poznanie niektórych właściwości aminokwasów i białek

Aminokwasy

Aminokwasy należą do najlepiej poznanych składników organizmów żywych. Są pochodnymi kwasów organicznych, w których jeden atom wodoru, najczęściej przy węglu α , jest podstawiony grupą aminową. Niektóre aminokwasy posiadają dwie grupy aminowe zlokalizowane przy różnych atomach węgla, nieliczne zawierają dwie lub nawet trzy grupy karboksylowe. Dwa aminokwasy; prolina i jej hydroksylowana pochodna – hydroksypolina, nie posiadają grupy aminowej, lecz grupę iminową, dlatego są nazywane iminokwasami.

Opisano ponad 300 różnych aminokwasów. Zdecydowana większość z nich występuje w postaci wolnej lub w połączeniach niebiałkowych, **a jedynie 20** występuje powszechnie w niemal wszystkich białkach. Obecność i umiejscowienie aminokwasów w strukturze cząsteczek białkowych jest zdeterminowane genetycznie. Niektóre aminokwasy np. hydroksypolina i hydroksylizyna, pojawiają się w białkach w wyniku modyfikacji reszt aminokwasowych wcześniej wbudowanych do łańcucha białkowego.

Fragment cząsteczki aminokwasu, złożony z węgla α , grupy α -aminowej i grupy α -karboksylowej jest wspólnym elementem strukturalnym wszystkich aminokwasów białkowych (z wyjątkiem iminokwasów). W fizjologicznym pH (około 7,4) większość grup karboksylowych jest zdysocjowana, tworzy anion $-\text{COO}^-$, a większość grup aminowych wiąże H^+ tworząc kation $-\text{NH}_3^+$. W tych warunkach dominującą formą aminokwasu jest więc jon obojnaczy, będący nośnikiem dwóch przeciwstawnych ładunków elektrycznych. Dlatego, do celów dydaktycznych, przyjęto jako regułę, zapisywanie wzorów strukturalnych aminokwasów z grupą aminową w postaci kationowej $-\text{NH}_3^+$ i grupą karboksylową w postaci anionowej $-\text{COO}^-$.

Właściwości chemiczne, wspólne dla wszystkich aminokwasów, wynikają z obecności w ich cząsteczkach grupy α -karboksylowej i α -aminowej. Wszystkie aminokwasy, zawierające wolną grupę α -aminową, w **reakcji**

z ninhydryną tworzą produkty o barwie niebiesko-fioletowej, natomiast prolina i hydroksypolina, zawierające grupę iminową, tworzą produkty o barwie żółtej. W trakcie reakcji ninhydrynowej aminokwas ulega dekarboksylacji i deaminacji, a uwolniony amoniak wiąże się z ninhydryną tworząc produkt barwy niebiesko-fioletowej.

Pozostałe fragmenty cząsteczek aminokwasów, zespolone z węglem α , noszą nazwę łańcuchów bocznych lub podstawników bocznych. Oznacza się je symbolem **R**. To one nadają aminokwasom ich indywidualne właściwości. Struktura łańcucha bocznego decyduje o roli aminokwasu w białku. Łańcuchy boczne różnią się bowiem składem pierwiastkowym, strukturą przestrzenną, wielkością, ładunkiem elektrycznym, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych oraz reaktywnością chemiczną. W podstawnikach tych mogą występować: dodatkowa grupa aminowa, grupa amidowa, dodatkowa grupa karboksylowa, grupa $-SH$, grupa $-S-CH_3$, grupa $-OH$, grupa guanidynowa oraz podstawniki pierścieniowe: fenyłowy, hydroksyfenyłowy, indolowy lub imidazolowy. Obecność tych grup sprawia, iż poszczególne aminokwasy można wykryć w materiale biologicznym prostymi metodami, możliwymi do zastosowania w warunkach laboratorium studenckiego. Dotyczy to zarówno aminokwasów wolnych, jak i wchodzących w skład cząsteczki białka.

Pierścienie aromatyczne **fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu** pod działaniem kwasu azotowego tworzą nitropochodne barwy żółtej. Proces ten nosi nazwę **reakcji ksantoproteinowej**.

Tyrozyna, podobnie jak i inne fenole, reaguje z odczynnikiem Millona, który jest roztworem azotanów (V) i azotanów (III) rtęci w kwasie azotowym. Nitrofenole, powstające z tyrozyny pod działaniem kwasu azotowego (V), tworzą z rtęcią kompleksy barwy czerwonej. Ogrzewanie mieszaniny, zawierającej wolną lub peptydowo związaną tyrozinę oraz odczynnik Millona, powoduje powstanie czerwonego osadu.

Aminokwasy zawierające siarkę: **cysteina** i **metionina**, w silnie alkalicznym środowisku ulegają degradacji uwalniając jony siarczkowe, które reagują z octanem ołowiu (II). Powstaje brunatno-czarny siarczek ołowiu (II).

Pierścień indolowy **tryptofanu** reaguje z kwasem glioksalowym w obecności kwasu siarkowego (VI), tworząc produkt o barwie czerwono-fioletowej. Kwas glioksalowy występuje (jako składnik zanieczyszczający) w handlowym preparacie stężonego kwasu octowego.

Peptydy i białka

Białka zbudowane są z L- α -aminokwasów połączonych **wiązaniem peptydowym**. Dwa aminokwasy wiążą się ze sobą w wyniku reakcji grupy α -karboksylowej jednego z nich z grupą α -aminową drugiego. Odłącza się cząsteczka wody, powstaje wiązanie peptydowe. Produktem reakcji dwóch aminokwasów jest dipeptyd, zachowujący wolną grupę α -aminową jednego z aminokwasów i wolną grupę α -karboksylową drugiego z nich. Grupa karboksylowa dipeptydu może reagować z grupą aminową trzeciego aminokwasu tworząc następne wiązanie peptydowe. Tą drogą dipeptyd przekształca się w tripeptyd, itd. Peptydy złożone z kilku - kilkunastu aminokwasów to oligopeptydy, dłuższe noszą nazwę polipeptydów. Polipeptyd zawierający ponad 100 reszt aminokwasowych jest nazywany białkiem.

Skład aminokwasowy białek jest bardzo zróżnicowany. Niektóre, np. **albumina** (białko jaja kurzego), zawierają wszystkie aminokwasy budujące białka; inne, np. **żelatyna** (zdenaturowany kolagen) nie zawierają cysteiny i tryptofanu. Zawierają jedynie znikome, niewykrywalne w naszych warunkach, ilości fenyloalaniny i tyrozyny.

Wiązanie peptydowe ma cechy wiązania podwójnego o konfiguracji *trans*. Tlen grupy C=O i wodór grupy N-H są skierowane w przeciwne strony. Atomy C i O grupy C=O oraz atomy N i H grupy N-H, wraz z sąsiednimi atomami C- α , leżą w jednej płaszczyźnie. Struktura wiązań peptydowych przypomina wiązania występujące w prostym związku zwanym **biuretem**. Od niego wywodzi się nazwa **reakcji biuretowej**, charakterystycznej zarówno dla biuretu, jak i dla peptydów czy białek.

Reakcja biuretowa jest powszechnie stosowaną reakcją barwną, służącą do wykrywania oraz ilościowego oznaczania peptydów i białek. Jest ona charakterystyczna dla struktur, które posiadają, co najmniej dwa wiązania peptydowe. W obecności peptydu lub białka **odczynnik biuretowy**, będący roztworem CuSO_4 , NaOH i winianu sodowo-potasowego, zmienia barwę z niebieskiej na fioletową. W alkalicznym środowisku powstaje kompleks Cu^{2+} z peptydem lub białkiem oraz z winianem. Ten ostatni zwiększa rozpuszczalność całego kompleksu. Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia białka w roztworze.

Strukturę białek można rozpatrywać na czterech „poziomach”. Są to struktury: pierwszorzędowa, drugorzędowa, trzeciorzędowa i czwartorzędowa. Trzy ostatnie są określane wspólną nazwą: **konformacja białka**.

Denaturacja białka polega na zniszczeniu jego struktur przestrzennych z zachowaniem struktury pierwszorzędowej. Ciągłość łańcucha polipeptydowego pozostaje nienaruszona. Istotą denaturacji jest rozpad wiązań o niskiej energii, które stabilizują strukturę przestrzenną białka. Czynnikiem denaturującym są przede wszystkim: podwyższona temperatura (na ogół powyżej 58-60° C), rozpuszczalniki organiczne, kwasy, zasady, jony metali ciężkich (np. Hg^{2+} , Pb^{2+}), stężone roztwory mocznika lub chlorowodoru guanidyny. Zdenaturowane białko traci aktywność biologiczną, np. enzym traci swoje właściwości katalityczne, przeciwciało - zdolność wiązania antygeny, kolagen zdolność do tworzenia włókien, a hemoglobina zdolność do wiązania tlenu. Denaturacja białka na ogół zmienia jego rozpuszczalność. Białko rozpuszczalne traci rozpuszczalność, białko nierozpuszczalne staje się rozpuszczalnym.

Białka rozpuszczalne w wodzie tworzą roztwory rzeczywiste lub koloidowe. Trwałość roztworów białek zależy głównie od ładunku elektrycznego cząsteczek, stopnia ich uwodnienia i temperatury. Białko, które wskutek działania czynnika denaturującego utraciło charakter koloidu, zwykle wypada z roztworu.

W y k o n a n i e

1. Reakcja ninhydrynowa - wspólna dla wszystkich aminokwasów

Do 1 ml rozcieńczonego, obojętnego roztworu aminokwasu dodać kilka kropli roztworu ninhydryny, a następnie ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilkadziesiąt sekund. Zaobserwować zmianę zabarwienia.

2. Reakcje charakterystyczne dla poszczególnych aminokwasów

a. wykrywanie aminokwasów aromatycznych - próba ksantoproteinowa

Do 1 ml roztworu **albuminy** dodać 0,5 ml stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez około 30 sekund. W miarę ogrzewania powstaje żółte zabarwienie, które pogłębia się po dodaniu kilku kropli 20% roztworu NaOH. Powtórzyć próbę z roztworem **żelatyny** i porównać wynik (żółta barwa nie pojawia się).

b. wykrywanie tyrozyny

Do 2 ml roztworu **albuminy** i do 2 ml roztworu **żelatyny** dodać po 0,5 ml odczynnika Millona i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 30 sekund. Tylko w reakcji odczynnika z albuminą powstaje czerwony, nierozpuszczalny produkt.

c. wykrywanie aminokwasów siarkowych – próba cysteinowa

Do 0,5 ml roztworu **albuminy** i do 0,5 ml roztworu **żelatyny** dodać po 0,5 ml 20% roztworu NaOH i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez minutę. Następnie, do obu probówek dodać po 1-2 kropli roztworu octanu ołowiu (II). Tylko roztwór albuminy barwi się na kolor brunatny lub czarny wskutek powstania zawiesiny siarczku ołowiu (II).

d. wykrywanie tryptofanu

Do 1,0 ml roztworu **albuminy** i do 1,0 ml roztworu **żelatyny** dodać po 1,0 ml stężonego kwasu octowego (zawierającego kwas glioksalowy), a następnie dodać ostrożnie, po ściance probówek, około 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego. Tylko w probówce zawierającej albuminę na granicy warstw pojawi się czerwono-fioletowy pierścień, świadczący o obecności tryptofanu.

3. Wykrywanie wiązania peptydowego - próba biuretowa

Do 1,0 ml roztworu albuminy dodać 0,5 ml 2M NaOH, a następnie kroplami dodawać roztwór siarczuanu miedzi (II). Płyn zmienia zabarwienie z niebieskiego na fioletowe. Powtórzyć próbę z roztworem **żelatyny** i porównać wynik.

4. Denaturacja termiczna białek

Ogrzać we wrzącej łaźni wodnej 3 ml roztworu albuminy. Płyn opalizuje, lecz osad nie powstaje. Zawartość probówki oziębic i dodawać stopniowo kroplami 1% kwas octowy. Początkowo powstaje osad, który rozpuszcza się w nadmiarze kwasu octowego.

5. Wytrącanie białek alkoholem etylowym

Ochłodzić, przez zanurzenie w mieszaninie wody z lodem, w oddzielnych probówkach 1 ml surowicy krwi i 5 ml 96% etanolu. Następnie zmieszać oba płyny. Zaobserwować wypadanie białka z roztworu. Odsączyć wytrącone białko i rozpuścić je (na sączku) w wodzie destylowanej.

Wykonać drugą, taką samą próbę bez chłodzenia, a mieszaninę surowicy krwi z etanolem pozostawić w temperaturze pokojowej przez godzinę i następnie przesączyć. Powstały osad nie powinien rozpuszczać się w wodzie.

6. Działanie stężonego kwasu azotowego na białko

Wlać do probówki 1 ml stężonego kwasu azotowego (V), a potem ostrożnie, po ściance pochylonej probówki wprowadzić podobną objętość roztworu albuminy (uniknąć mieszania obu płynów). Na granicy obydwu płynów powstaje biało-żółta warstwa zdenaturowanego białka.

Z a d a n i e

Ustalić, czy badany roztwór zawiera białko. Czy jest to **albumina**, czy **żelatyna**?

W tym celu należy wykonać:

- próbę na obecność białka
- próbę ksantoproteinową na obecność aminokwasów aromatycznych
- próbę na obecność tyrozyny
- próbę cysteinową na obecność aminokwasów siarkowych
- próbę na obecność tryptofanu.

Właściwości białek w roztworach

Cel ćwiczenia: poznanie niektórych właściwości białek w roztworach, pomiar stężenia białka

Rozpuszczalność białek jest bardzo zróżnicowana. Niektóre są całkowicie nierozpuszczalne (np. keratyna, elastyna) lub wykazują znikomą rozpuszczalność (np. kolagen). Inne rozpuszczają się bardzo dobrze (np. hemoglobina, albuminy). Rozpuszczalnikami dla białek są: woda lub roztwory wodne soli, kwasów i zasad, mocznika lub detergentów. Rozpuszczalność zależy przede wszystkim od obecności aminokwasów polarnych w cząsteczce białka. Białka o dużej zawartości aminokwasów polarnych dobrze rozpuszczają się w środowisku wodnym. Grupy polarne łańcuchów bocznych aminokwasów wytwarzają wiązania wodorowe z cząsteczkami wody. Cząsteczki białka otaczają się płaszczem wodnym. Białka, w których dominują aminokwasy niepolarne, mają ograniczone możliwości wiązania wody, są zatem nierozpuszczalne.

Roztwory białek są na ogół **roztworami rzeczywistymi**, o monomolekularnym stopniu dyspersji. Niekiedy jednak cząsteczki białek asocjują, tworząc agregaty złożone z dwóch lub kilku cząsteczek. Roztwór białka przybiera wtedy cechy **roztworu koloidalnego**.

Białka wykazują **właściwości amfoteryczne**. Zachowują się w roztworze (zależnie od pH) jak kwasy lub zasady. Właściwość ta uwarunkowana jest głównie obecnością grup polarnych z ładunkiem elektrycznym w łańcuchach bocznych niektórych aminokwasów. Grupy **-NH₂** wiążą jony **H⁺** obecne w roztworze zapobiegając zakwaszeniu, a protony odłączane w trakcie dysocjacji grup **-COOH** zobojętniają jony **-OH⁻**, zapobiegając jego alkalizacji.

Ta właściwość aminokwasów, peptydów i białek ma istotne znaczenie w utrzymaniu **równowagi kwasowo-zasadowej** tkanek i płynów ustrojowych. Właściwości kwasowe nadają białku przede wszystkim grupy **β**-karboksylowe reszt kwasu asparaginowego i **γ**-karboksylowe reszt kwasu glutaminowego, które dysocjują uwalniając protony (H⁺) i tworząc ujemnie naładowane grupy **-COO⁻**. Środowisko zasadowe sprzyja dysocjacji grup karboksylowych i przechodzeniu białek w formę anionową. Właściwości

zasadowe nadają białku grupy ϵ -aminowe reszt lizyny, grupy guanidynowe reszt argininy i pierścienie imidazolowe reszt histydyny. Mogą one wiązać protony (H^+) nadając cząsteczce białka ładunek dodatni. Środowisko kwaśne sprzyja wiązaniu protonów przez wyżej wymienione grupy i przechodzeniu białka w formę kationową.

Pojedyncze grupy α -aminowe i α -karboksylowe, występujące w aminokwasach N-końcowych i C-końcowych, mają niewielki wpływ na sumaryczny ładunek elektryczny cząsteczki białka.

Każde białko ma charakterystyczną dla siebie wartość pH, w której liczba ładunków dodatnich i ujemnych na powierzchni cząsteczki równoważą się nawzajem. Tę wartość pH nazywamy punktem **izoelektrycznym - pI**. W punkcie izoelektrycznym sumaryczny ładunek elektryczny cząsteczki białka równa się zero. W tych warunkach białko nie przemieszcza się w polu elektrycznym, a jego rozpuszczalność jest najmniejsza.

W środowisku o pH wyższym od punktu izoelektrycznego białka wykazują **ujemny** ładunek wypadkowy i mogą tworzyć związki z kationami metali ciężkich. Oddziaływanie kwaśne utrudnia przebieg tych reakcji, gdyż dysocjacja grup karboksylowych zostaje cofnięta. Białko traci właściwości anionowe i nie reaguje z kationami.

W środowisku o pH niższym od punktu izoelektrycznego wypadkowy ładunek białka staje się **dodatni**. Protony pochodzące z dysocjacji kwasów obecnych w roztworze wiążą się z grupami aminowymi, tworząc dodatnio naładowane grupy NH_3^+ . Białko, w postaci kationowej, można wytrącić z roztworu odczynnikami alkaloidowymi, które są nośnikami ładunku ujemnego. Należą do nich między innymi kwasy: sulfosalicylowy i pikrynowy, oraz heksacyjanożelazian. Odczynniki alkaloidowe zawdzięczają nazwę swoją zdolności do wytrącania alkaloidów z roztworów. Alkaloidy są to azotowe związki organiczne o charakterze słabych zasad. Niektóre z nich wykazują aktywność farmakologiczną (np. morfina).

Białka można oddzielić od związków drobnocząsteczkowych w procesie zwanym **dializą**. Do tego celu stosuje się worki dializacyjne sporządzone z błony półprzepuszczalnej (np. z celofanu). Związki drobnocząsteczkowe, znajdujące się w roztworze zawartym wewnątrz worka, przenikają do wody otaczającej worek, dążąc do wyrównania stężeń po obydwu stronach błony. Natomiast związki wielkocząsteczkowe, np. białka, nie przechodzą przez błony

półprzepuszczalne. Przez wielokrotną zmianę płynu dializacyjnego (np. wody) i przy dostatecznie długim czasie dializy (2-3 doby) można praktycznie całkowicie uwolnić roztwór białka od zawartych w nim soli. Tą samą drogą można wprowadzić sól do wnętrza worka dializacyjnego lub wymienić jeden roztwór soli na drugi, nie zmieniając stężenia białka w dializowanym roztworze.

Wyraźny wpływ na rozpuszczalność białek mają niektóre sole obojętne np. siarczan amonu, chlorek sodu. Niskie stężenia tych soli zwiększają rozpuszczalność wielu białek. Postępujący wzrost stężenia soli w roztworze powoduje dehydratację białek, a w konsekwencji obniża ich rozpuszczalność. Przy odpowiednio wysokich stężeniach soli można całkowicie wytrącić białka z roztworu. Zjawisko to nosi nazwę **wysalania**. Jest to jedna z metod frakcjonowania białek. Białka surowicy krwi można rozdzielić przez wysalanie siarczanem amonu - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Globuliny wytrącają się z roztworu przy 50% nasyceniu siarczanem amonu, natomiast albuminy przy całkowitym wysyceniu roztworu tą solą.

W y k o n a n i e

1. Wytrącanie białek stężonymi roztworami soli - wysalanie

Do 5 ml nierozcieńczonej surowicy krwi dodać 5 ml nasyconego roztworu siarczanu amonu i wymieszać. Przesączyć przez suchy sączonek do suchej probówki. Na sączku pozostaną wytrącone globuliny, natomiast albuminy pozostają w roztworze. Sączonek należy przenieść do innej probówki i osad globulin rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej (potrzebna do ich rozpuszczenia ilość soli znajduje się na sączku) – globuliny przejdą do roztworu. Wykonać próbę biuretową na obecność białka w tym roztworze.

Przesączonek zawierający albuminy podzielić na dwie części. Z jedną wykonać próbę biuretową. Drugą przenieść do miseczki porcelanowej i dodawać siarczan amonu (w substancji), który należy rozcierać (używając zatopionego końca probówki) aż do zupełnego wysycenia roztworu. Przesączyć a otrzymany przesączonek poddać próbie biuretowej. Porównać wyniki.

2. Amfoteryczne właściwości białek

Do dwóch probówek dodać po 2 ml wody i po 3 krople błękitu tymolowego, który jest wskaźnikiem pH. Do jednej z nich dodać kroplami tyle rozcieńczonego NaOH, aby płyn przybrał barwę niebieską (środowisko alkaliczne), a do drugiej rozcieńczonego HCl, aby wystąpiła wyraźna barwa czerwona (środowisko kwaśne). Należy uniknąć nadmiaru NaOH i HCl. Do obydwu probówek należy dodawać kroplami tyle roztworu białka (surowicy krwi), aby zobojętnić zarówno kwas, jak i zasadę, co można stwierdzić przez zmianę zabarwienia błękitu tymolowego (wskaźnika pH) do stanu wyjściowego.

3. Wytrącanie białka anionowego solami metali ciężkich

a. próba z jonem Fe^{3+}

Do 3 ml roztworu białka jaja kurzego dodawać kroplami rozcieńczony roztwór $FeCl_3$. Powstaje osad, który rozpuszcza się w miarę dalszego dodawania odczynnika.

b. próba z jonem Pb^{2+}

Do 3 ml roztworu białka jaja kurzego dodawać kroplami roztwór octanu ołowiu (II). Wytrąca się osad.

4. Wytrącanie białka kationowego odczynnikami alkaloidowymi

a. próba z heksacyjanożelazianem

Do 2 ml roztworu białka, zakwaszonego kilkoma kroplami stężonego kwasu octowego, dodać kilka kropli heksacyjanożelazianu (III) potasu. Powstaje biały osad.

b. próba Essbacha

Do 2 ml roztworu białka dodać taką samą objętość odczynnika Essbacha, składającego się z kwasu pikrynowego i kwasu cytrynowego. Powstaje żółty osad.

c. próba z kwasem sulfosalicylowym

Do 2 ml roztworu białka, zakwaszonego kilkoma kroplami stężonego kwasu octowego, dodać kilka kropli 10% kwasu sulfosalicylowego. Powstaje biały osad.

5. Dializa

Do probówki wlać 5 ml roztworu białka, 5 ml 0,9% NaCl i 5 ml 10% roztworu glukozy. Wymieszać zawartość probówki i przelać do worka dializacyjnego. Worek należy zawiązać i przymocować do bagietki szklanej. Ułożyć bagietkę poziomo na krawędzi zlewki o pojemności 200 ml i dodać tyle wody destylowanej, aby jej poziom zrównał się z poziomem płynu w worku dializacyjnym. Zawartość zlewki mieszać, co 10-15 minut przez delikatne wstrząsanie lub poruszanie workiem. Po 2 godzinach wykonać próby na obecność chlorku, glukozy i białka w dializowanym roztworze (pobranym z wnętrza worka dializacyjnego) oraz w płynie dializacyjnym.

a. próba na obecność chlorku

Przygotować dwie probówki. Do pierwszej przenieść 1 ml dializowanego roztworu, a do drugiej 1 ml płynu dializacyjnego. Do obydwu dodać kilka kropi 0,1M AgNO_3 i wymieszać. Jony chlorkowe reagują z jonami srebra tworząc nierozpuszczalny AgCl .

b. próba na obecność glukozy

Przygotować dwie probówki. Do pierwszej przenieść 0,5 ml dializowanego roztworu, a do drugiej 0,5 ml płynu dializacyjnego. Do każdej z probówek dodać po 2 ml odczynnika Benedicta (niebieski), zawierającego jony Cu^{2+} , wymieszać. Obie próby ogrzewać przez około 5 minut we wrzącej łaźni wodnej, a następnie oziębnić. Glukoza redukuje Cu^{2+} do Cu^+ . Zaobserwować powstawanie pomarańczowego osadu tlenku miedzi (Cu_2O).

c. próba na obecność białka - próba biuretowa

Przygotować dwie probówki. Do pierwszej przenieść 1 ml dializowanego roztworu, a do drugiej 1 ml płynu dializacyjnego. Do obu probówek dodać 0,5 ml 2M NaOH, a następnie 0,5 ml roztworu siarczanu miedzi (II). Porównać zabarwienia.

6. Ilościowe oznaczanie białka metodą biuretową

Do probówek 1-4 dodawać kolejno po 1 ml standardowych roztworów białka o stężeniach: 10, 20, 40 i 60 mg/ml. Do probówki 5-ej dodać 1 ml próby badanej, a do probówki 6-ej 1 ml H_2O (próba kontrolna). Następnie do każdej z tych probówek dodać po 4 ml odczynnika biuretowego i dokładnie wymieszać. Roztwory zawierające białko przybierają barwę fioletową, której

intensywność narasta w czasie, osiągając maksimum po upływie 20 minut. Po tym czasie odczytać absorbancję w poszczególnych próbach (próbówki 1-5) przy długości fali 550 nm w stosunku do próby kontrolnej (próbówka 6).

Sporządzić wykres kalibracyjny, uwzględniający zależność absorbancji od stężenia białka (na osi rzędnych oznaczyć absorbancję, na osi odciętych - stężenie białka) a następnie odczytać stężenie białka w próbce badanej.

Z a d a n i e

Oznaczyć stężenie białka metodą biuretową. Wyniki pomiaru przedstawić w mg/ml.

Białka krwi

Cel ćwiczenia: poznanie niektórych właściwości białek krwi

Krew jest jedyną tkanką płynną, będącą w ciągłym ruchu. Pełni w organizmie przede wszystkim funkcje transportowe. W jej składzie znajdują odzwierciedlenie niemal wszystkie stany chorobowe. W przebiegu różnych procesów patologicznych we krwi krążącej pojawiają się składniki, które nie występują we krwi osób zdrowych. Zawartość wielu składników we krwi wzrasta lub maleje w przebiegu chorób. Łatwość pobrania krwi (bez szkody dla chorego) pozwala na jej szerokie wykorzystanie, jako materiału diagnostycznego. Jeżeli krew zostanie pobrana do naczynia zawierającego substancję hamującą jej krzepnięcie (*antykoagulant*), np. heparynę lub substancję wiążącą jony Ca^{2+} , jak wersenian sodowy (*EDTA*), szczawian lub cytrynian, nie krzepnie. Poprzez wirowanie można oddzielić krwinki, osiadające na dnie próbówki, od płynnego **osocza krwi**. Osocze zawiera wszystkie pozakomórkowe składniki białkowe krwi, wśród nich fibrynogen i inne białkowe czynniki krzepnięcia. Jeżeli krew zostanie pobrana do naczynia bez antykoagulanta, krzepnie w czasie kilku minut. Skrzep ulega obkurczeniu (*retrakcji*), uwalniając płyn zwany surowicą. Obkurczony skrzep, zawierający głównie fibrynę (przekształcony fibrynogen) i komórki „uwięzione” w jego wnętrzu, można usunąć przez wirowanie. Nad osadem gromadzi się **surowica krwi**.

Surowica krwi nie zawiera fibrynogenu i kilku innych czynników białkowych zużywanych w czasie jej krzepnięcia. Poza tym skład surowicy i osocza jest bardzo podobny.

Krew jest zawiesiną komórek (krwinek czerwonych, białych i płytek krwi) w płynnym osoczu. Osocze krwi składa się w 90% z wody i w 10% z substancji stałych. Substancje stałe krwi można podzielić na:

1. Substancje organiczne:

azotowe: - **białka:** albuminy, globuliny, fibrynogen, enzymy, hormony białkowe

- **składniki niebiałkowe:** mocznik, kwas moczowy, kreatynina, bilirubina, wolne aminokwasy

bezażotowe: glukoza, lipidy

2. Substancje nieorganiczne - kationy i aniony: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}

Głównym białkiem krwinek czerwonych jest **hemoglobina**. Jej rola biologiczna polega na wiązaniu tlenu podczas przepływu krwi przez naczynia włosowate płuc i przenoszeniu O_2 do tkanek pozapłucnych. Hemoglobina jest hemoproteina, zbudowaną z czterech, parami jednakowych, podjednostek α i β . Skład cząsteczki hemoglobiny można zapisać symbolem: $\alpha_2\beta_2$. Każda z podjednostek zawiera cząsteczkę hemu z jonem żelaza Fe^{2+} , zdolnym do wiązania 1 cząsteczki tlenu. Związanie tlenu (utlenowanie hemoglobiny) nie zmienia stopnia utlenienia żelaza.

Hemoglobina pochłania niektóre składowe widma światła widzialnego. Hemoglobina utlenowana (oksyhemoglobina) i hemoglobina odtlenowana (deoksyhemoglobina) różnią się od siebie widmem absorpcji światła widzialnego. Roztwór oksyhemoglobiny, oceniany spektrofotometrycznie, wykazuje dwa szczyty absorpcji, w żółtej i zielonej części widma (578 nm i 540 nm). Substancje redukujące, np. wodorosiarczan (IV) sodu (NaHSO_3), powodują przejście oksyhemoglobiny w deoksyhemoglobinę, co skutkuje zmianą widma absorpcji światła widzialnego. Roztwór deoksyhemoglobiny zmienia barwę na czerwono-fioletową i wykazuje jedno maksimum absorpcji przy 565 nm, na granicy żółtej i zielonej części widma.

Białka osocza krwi

Stężenie białek w osoczu wynosi 6-8% (w/v). Białka te różnią się zarówno budową, jak i funkcją. W zależności od stosowanej metody rozdzielania otrzymano i opisano różne frakcje białkowe. Najprostszą metodą rozdzielania białek jest ich frakcjonowanie przez dodawanie różnych soli (np. siarczanu amonu, chlorku sodu) we wzrastających stężeniach (wysalanie). Umożliwia to rozdział białek osocza na kilka głównych frakcji, w najprostszym przypadku na **albuminy, globuliny i fibrynogen**.

Albuminy stanowią ponad połowę wszystkich białek osocza, łatwo rozpuszczają się w wodzie, utrzymują prawidłowe ciśnienie osmotyczne, pełnią funkcje transportowe. **Globuliny** słabo rozpuszczają się w wodzie, a dobrze w roztworach soli. Pełnią rolę białek enzymatycznych, transportowych i odpornościowych.

Fibrynogen jest białkiem osocza umożliwiającym krzepnięcie krwi. Istotą tego procesu jest przemiana rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę. Chroni to organizm przed nadmierną utratą krwi w przypadku przerwania ciągłości ściany naczyniowej. Jednym z czynników warunkujących prawidłowe krzepnięcie są jony wapniowe (Ca^{2+}). Aniony cytrynianowe, szczawianowe, lub wersenianowe wiążą jony Ca^{2+} , tworząc z nimi bardzo słabo dysocjujące lub nierozpuszczalne sole. Z tego powodu rozpuszczalne i dobrze dysocjujące cytryniany, szczawiany lub werseniany (sodu, potasu, amonu) są używane, jako substancje zapobiegające krzepnięciu krwi. Umożliwiają one utrzymanie wynaczynionej krwi (lub samego osocza) w stanie płynnym. Dodanie nadmiaru jonów wapniowych (np. w postaci dobrze dysocjującego CaCl_2) wiąże wszystkie wspomniane aniony, a pozostałe jony Ca^{2+} , które nie przereagowały ze szczawianem lub cytrynianem, przywracają krwi (lub osoczu) zdolność do krzepnięcia. Dodanie aktywnej *trombiny* (enzymu katalizującego przemianę fibrynogenu do monomeru fibryny) powoduje natychmiastowe krzepnięcie krwi (lub osocza) niezależnie od obecności jonów Ca^{2+} . *Trombina* działa bowiem bezpośrednio na fibrynogen, który jest specyficznym substratem dla tego enzymu.

W celu oznaczenia **stężenia fibrynogenu** osocze „szczawianowe” lub „cytrynianowe” poddaje się działaniu CaCl_2 . Wytwarza się skrzep. Rozpuszczalny fibrynogen przechodzi w nierozpuszczalną fibrynę. Po wypłukaniu innych białek, skrzep rozpuszcza się w roztworze NaOH i oznacza się w nim tyrozynę – aminokwas, którego zawartość w fibrynogenie jest wartością znaną. Na podstawie zawartości tyrozyny w skrzepie można obliczyć stężenie fibrynogenu w osoczu, które poddano krzepnięciu. Zawartość tyrozyny oznacza się kolorymetrycznie metodą Lowry. Metoda ta polega na redukcji przez tyrozynę kwasów fosfowolframowego i fosfomolibdenowego, zawartych w odczynniku Folina-Ciocalteu'a. Roztwór przybiera niebieskie zabarwienie, którego intensywność jest miarą zawartości tyrozyny.

Elektroforeza białek osocza krwi

Jednym ze sposobów rozdziału białek osocza krwi jest elektroforeza. Uzyskane tą drogą frakcje stanowią podstawę ogólnie przyjętego podziału białek na **albuminy, α_1 -globuliny, α_2 -globuliny, β -globuliny, γ -globuliny oraz fibrynogen**. Wzajemne relacje ilościowe pomiędzy poszczególnymi frakcjami białek osocza człowieka zdrowego są dość stałe. Białka osocza (lub surowicy) umieszczone w polu elektrycznym wędrują do anody lub do katody w zależności od pH środowiska.

W elektroforezie bibułowej nośnikiem jest pasek bibuły nasycony buforem. W pH 8,6 białka te uzyskują ładunek ujemny, a więc wędrują do anody. Szybkość wędrówki poszczególnych białek w polu elektrycznym zależy od ich ładunku oraz wielkości i kształtu cząsteczek. Po przeprowadzonym rozdziale paski suszy się w 105°C i poszczególne frakcje wybarwia się odpowiednimi barwnikami, np. błękitem bromofenolowym. Ilość barwnika związanego z białkiem jest w przybliżeniu wprost proporcjonalna do ilości białka. Poszczególne frakcje można oddzielić poprzez wycięcie odpowiednich pasm z elektroforegramu. Barwnik ten można wypłukać, oznaczyć kolorymetrycznie jego stężenie i określić tą drogą procentowy udział poszczególnych frakcji w ogólnej ilości białka.

Inne metody rozdziału białek krwi (elektroforeza na nośnikach żelowych, immunoelektroforeza, chromatografia kolumnowa, ogniskowanie izoelektryczne) umożliwiają rozdział białek osocza krwi na kilkadziesiąt frakcji.

W procesach patologicznych obserwuje się wiele różnorodnych zmian, nie tylko zmiany ogólnej ilości białka w osoczu (**hipo-** i **hiperproteinemie**), ale także zmian wzajemnych relacji ilościowych pomiędzy poszczególnymi frakcjami (**dysproteinemie**). Elektroforeza jest jedną z technik laboratoryjnych umożliwiających rozpoznanie dysproteinemii.

W y k o n a n i e

1. Badanie widma absorpcji światła widzialnego dla oksyhemoglobiny i deoksyhemoglobiny

a. badanie oksyhemoglobiny

Do probówki wlać około 5 ml roztworu hemoglobiny i intensywnie wstrząsać przez 2-3 minuty. Kontakt z powietrzem sprawia, iż hemoglobina nasycą się tlenem i przechodzi w oksyhemoglobinę, która charakteryzuje się czerwoną barwą.

b. badanie deoksyhemoglobiny

Do 5 ml roztworu oksyhemoglobiny (otrzymanej w poprzednim doświadczeniu) dodać kilka kryształków wodorosiarczanu (IV) sodu i energicznie wymieszać. Oksyhemoglobina traci tlen i przechodzi w deoksyhemoglobinę. Jasno-czerwony roztwór zmienia barwę na czerwono-fioletową.

c. pomiar absorbancji

Zmierzyć absorbancje obu prób w spektrofotometrze przy różnych długościach fal, wobec próby kontrolnej – woda destylowana.

L.p.	Długość fali [nm]	Absorbancja	
		oksy-Hb	deoksy-Hb
1.	510		
2.	540		
3.	565		
4.	578		
5.	600		

2. Oznaczanie zawartości fibrynogeny w osoczu

Do 0,5 ml osocza dodać 5 ml 0,9% NaCl i 4,5 ml 0,025M CaCl₂. Bardzo dokładnie wymieszać. Do próbki włożyć szklaną bagietkę i pozostawić w temperaturze pokojowej przez 60 minut. Osocze krzepnie, a powstały skrzep obkurcza się wokół bagietki. Po upływie tego czasu przenieść skrzep na sączek i przepłukać go trzykrotnie niewielką ilością 0,9% NaCl oraz trzykrotnie niewielką ilością wody destylowanej w celu usunięcia rozpuszczalnych białek osoczowych. Następnie przenieść skrzep (najlepiej ostrzem igły) do kalibrowanej próbki, dodać 2 ml 5% NaOH i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej (około 10 minut) aż do momentu całkowitego rozpuszczenia skrzepu. Następnie uzupełnić zawartość próbki wodą destylowaną do 10 ml i dobrze wymieszać. Przenieść 1 ml płynu do drugiej próbki, zawierającej 3 ml 10% Na₂CO₃, a następnie dodać 0,5 ml odczynnika Folina i dobrze wymieszać. Po 20 minutach odczytać absorbancję przy 670 nm wobec próby kontrolnej zawierającej 1 ml 1% NaOH, 3 ml 10% Na₂CO₃ i 0,5 ml odczynnika Folina. Intensywność zabarwienia roztworu jest miarą zawartości tyrozyny w próbce.

W celu oznaczenia zawartości tyrozyny należy sporządzić krzywą wzorcową. Do 1 ml roztworu zawierającego różne ilości tyrozyny: 10, 20, 40, 50, 100, 160 µg dodać 3 ml roztworu węgla sodu i 0,5 ml odczynnika Folina. Po 20 minutach zmierzyć absorbancję poszczególnych próbek i narysować krzywą wzorcową. Na osi rzędnych oznaczyć absorbancję, na osi odciętych - ilość tyrozyny.

Zawartość tyrozyny w badanej próbie należy odczytać z krzywej wzorcowej. Stężenie fibrynogenu w osoczu oblicza się z następującego równania:

$$X = \frac{T \times 10,8 \times 10}{0,9} = T \times 120$$

- X - stężenie fibrynogenu w mg na ml osocza
- T - ilość uwolnionej tyrozyny wyrażona w mg
- 10,8 - współczynnik pozwalający na przeliczenie ilości tyrozyny na ilość fibrynogenu
- 10 - rozcieńczenie próby
- 0,9 - objętość wyjściowa osocza (1 ml badanej próby zawiera 0,9 ml osocza + 0,1 ml roztworu szczawianu lub cytrynianu)

3. Elektroforeza bibułowa białek surowicy krwi

Należy zapoznać się z instrukcją obsługi aparatu do elektroforezy. Wyciąć 2 paski z arkusza bibuły *Whatman 1*, o wymiarach podanych w instrukcji i zaznaczyć ołówkiem miejsce naniesienia surowicy. Paski te umieścić w komorze aparatu i pozostawić w niej przez okres potrzebny do ich nasiąknięcia buforem weronalowym (około 30 minut). Następnie na każdy pasek nanieść kapilarą 5-10 μ l surowicy. Należy przy tym pamiętać, aby naniesione białko tworzyło jak najcieńszą linię, oddaloną co najmniej o 0,5 cm od każdego z brzegów paska. Przyłożyć napięcie zgodnie z instrukcją. Rozdział trwa kilka godzin.

Elektroforegramy wysuszyć w temperaturze 105°C i zabarwić roztworem błękitu bromofenolowego w etanolu. W tym celu należy zwinąć je w rulon, umieścić w zlewce, zalać roztworem błękitu bromofenolowego i pozostawić na 30 minut. Płyn należy mieszać kilkakrotnie przez wstrząsanie zlewką. Zlać barwnik z powrotem do butelki (nadaje się do ponownego użycia). Barwnik niezwiązany z białkami wypłukać dodając 0,5% kwas octowy. Całkowite usunięcie niezwiązanego barwnika uzyskuje się przez wstrząsanie elektroforegramów w zlewce przez 1 godzinę oraz kilkakrotną wymianę kwasu octowego. Po odbarwieniu paski przepłukać kilkakrotnie wodą destylowaną i wysuszyć na szkle w temperaturze pokojowej. Rozdzielone białka barwią się na kolor niebiesko-zielony.

Barwnik związany z białkiem można wypłukać (wyluować) i oznaczyć kolorymetrycznie. Doświadczenie to należy wykonać na 2 paskach. W tym celu należy przygotować 12 probówek oznaczonych kolejnymi numerami od

1 do 12. Na każdym z pasków zaznaczyć zwykłym ołówkiem granice poszczególnych frakcji. Zaznaczyć odpowiedniej wielkości odcinek niezabarwionej bibuły (6 i 12 to próby kontrolne). Wyciąć z pasków zaznaczone frakcje i włożyć je do przygotowanych probówek zgodnie z Tabelą I. Do każdej probówki odmierzyć po 5 ml 0,1M NaOH i eluować barwnik ze skrawków przez 45 minut, wstrząsając probówki co kilka minut. Oznaczyć absorbancję badanych prób, w relacji do próby kontrolnej, przy długości fali 560 nm.

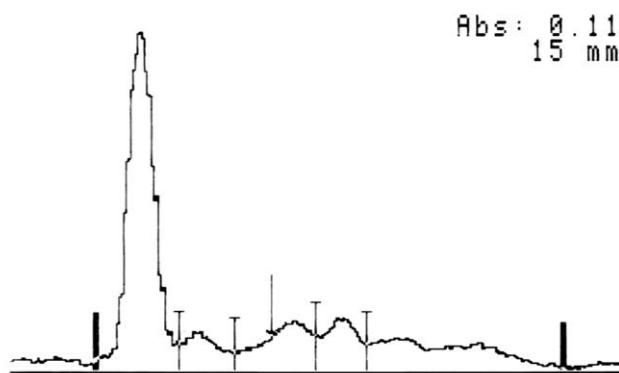
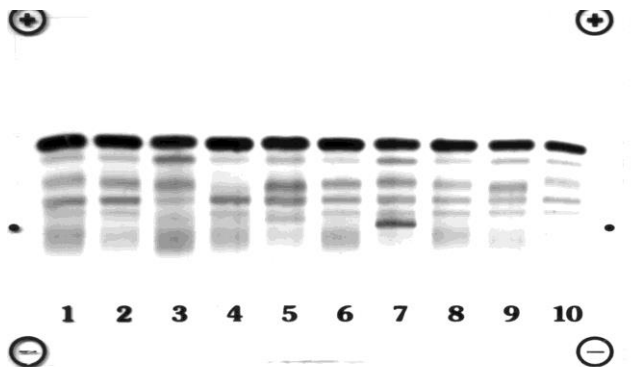
Obliczenia opierają się na założeniu, że suma absorbancji wszystkich frakcji białkowych odpowiada 100% białka naniesionego na pasek. Absorbancje poszczególnych frakcji, wyrażone w procentach tej sumy, dają procentowy skład frakcji białkowych surowicy - proteinogram. Wyliczone wartości należy przedstawić w Tabeli I.

Tabela I

	Pasek I			Pasek II		
	Nr próby	A ₅₆₀	% frakcji	Nr Próby	A ₅₆₀	% frakcji
albuminy	1			7		
α₁-globuliny	2			8		
α₂-globuliny	3			9		
β-globuliny	4			10		
γ-globuliny	5			11		
kontrola	6			12		

4. Analiza rozdziałów elektroforetycznych białek surowicy na octanie celulozy oraz ocena densytometryczna wybranych elektroforegramów

Oglądamy gotowe elektroforegramy. Zwracamy uwagę na zróżnicowanie ilościowe frakcji białek surowicy. Przykładowy elektroforegram przedstawia załączona rycina.



Wartości frakcji :

alb	59.34 %	3.38 g/dl
al1	6.26 %	0.36 g/dl
al2	12.01 %	0.68 g/dl
bet	9.44 %	0.54 g/dl
gam	12.95 %	0.74 g/dl

Rycina przedstawia elektroforegramy białek surowicy wraz z oceną densytometryczną, umożliwiającą pomiar ilościowy poszczególnych frakcji.

Zadanie

Oznaczyć stężenie fibrynogenu.

Kwasy nukleinowe

Cel ćwiczenia: poznanie składu i niektórych właściwości kwasów nukleinowych

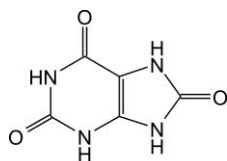
Kwasy nukleinowe są zbudowane z **nukleotydów**. Elementem składowym każdego nukleotydu jest zasada purynowa (adenina lub guanina) albo pirymidynowa (cytozyna, uracyl lub tymina), cukier pięciowęglowy (ryboza lub deoksyryboza) oraz reszta kwasu ortofosforowego. Zasada wiąże się z cukrem wiązaniem N-β-glikozydowym, reszta kwasu ortofosforowego wiąże się ze składnikiem cukrowym wiązaniem estrowym poprzez grupę -OH przy węglu 3' lub 5' rybozy lub deoksyrybozy. Poszczególne nukleotydy są zespolone wiązaniami fosfodiestrowymi pomiędzy węglami 3' i 5'.

Kwasowy charakter nadają kwasom nukleinowym reszty ortofosforanowe, z których każda zawiera H⁺ zdolny do dysocjacji. Dzięki temu kwasy nukleinowe są **polianionami** - nośnikami wielu ładunków ujemnych, a to czyni je zdolnymi do interakcji z **polikationami**, szczególnie z białkami zasadowymi - będącymi nośnikami ładunków dodatnich. Wiążą się także z drobnocząsteczkowymi związkami o charakterze zasadowym, np. z błękitem metylenowym. W naturalnym środowisku DNA wiąże się przede wszystkim z białkami zasadowymi - **histonami**, natomiast RNA głównie z białkami obojętnymi - wchodzącymi w skład rybosomów. Kompleksy kwasów nukleinowych z białkami noszą nazwę **nukleoprotein**. W warunkach laboratorium studenckiego, sztuczne nukleoproteiny można otrzymać poprzez zmieszanie roztworu kwasu nukleinowego z surowicą krwi. W stężonych roztworach soli nukleoproteiny dysocjują na elementy składowe. W środowisku zasadowym kwasy nukleinowe tworzą sole - **nukleiniany**, które są dobrze rozpuszczalne w wodzie. Można je wytrącić z roztworu alkoholem etylowym.

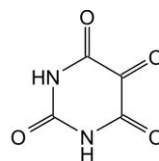
Składniki cukrowe kwasów nukleinowych: rybozę i deoksyrybozę, można wykryć bezpośrednio w roztworach tych kwasów lub ich soli bez konieczności ich wcześniejszej hydrolizy. **Ryboza** zawarta w RNA, nukleotydach i nukleozydach purynowych, ogrzewana ze stężonym HCl odwadnia się do furfuralu, który z orczyką w obecności jonów Fe³⁺ tworzy kompleks o trwałej zielonej barwie. **Deoksyryboza**, zawarta w DNA, podczas ogrzewania ze stężonym kwasem siarkowym, przekształca się w aldehyd hydroksylewulinowy. Związek ten w reakcji z difenylaminą tworzy kompleks

barwy niebieskiej. Zasady purynowe można wykryć jedynie w produktach hydrolizy tych kwasów. Preparat kwasu nukleinowego, przeznaczony do wykrywania puryn, należy poddać hydrolizie w kwasie siarkowym w temperaturze 100°C. Kwas nukleinowy ulega hydrolizie, początkowo do mononukleotydów. Mononukleotydy purynowe ulegają dalszej hydrolizie do zasad, pentoz i kwasu ortofosforowego. Pod działaniem tego kwasu następuje hydrolityczny rozpad wiązań N-β-glikozydowych pomiędzy puryną a rybozą lub deoksyrybozą. Uwalniają się zasady purynowe: adenina i guanina. **Zasady purynowe** strącają się łatwo, jako nierozpuszczalne kompleksy z jonami miedzi lub srebra. W tych samych warunkach nukleotydy pirymidynowe są trwałe i nie ulegają rozpadowi.

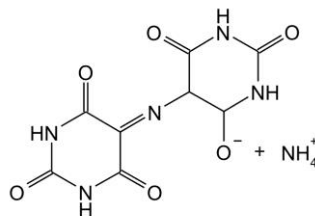
Końcowym produktem przemian zasad purynowych w organizmie człowieka jest słabo rozpuszczalny **kwas moczowy**. Sól sodowa tego kwasu (moczan sodowy) jest dość dobrze rozpuszczalna, natomiast moczany amonu, miedzi i srebra są trudno rozpuszczalne w wodzie. Redukujące właściwości kwasu moczowego sprawiają, iż jest on ważnym antyutleniaczem biologicznym. Unieczynnia reaktywne formy tlenu oraz zapobiega ich powstawaniu.



Kwas moczowy



Alloksan



Mureksyd

Kwas moczowy jest utleniany przez działanie kwasu azotowego (V) do alloksanu i mocznika. Kondensacja dwóch cząsteczek alloksanu z amoniakiem powoduje powstanie kwasu mureksydowego. Jego sole noszą nazwę mureksydów. W reakcji z jonem NH_4^+ tworzy się mureksyd amonowy barwy purpurowej, a w reakcji z jonem Na^+ powstaje mureksyd sodowy barwy niebieskiej.

Wykonanie

1. Preparatyka kwasów nukleinowych z drożdży

Okolo 25 g drożdży piekarskich zawiesić w 30 ml 10% NaCl. Rozetrzeć dnem probówki, dodać 30 kropeł alkoholowego roztworu czerwieni fenolowej, a następnie zawiesinę zobojętnić, najpierw 10% NaOH, potem 2% NaOH do czerwono-pomarańczowego zabarwienia. Zawiesinę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 30 minut, okresowo mieszając. Kwasy nukleinowe przechodzą do roztworu. Po ochłodzeniu mieszaninę odwirować lub odsączyć. Kwasy nukleinowe pozostają w przesączu (w przypadku sączenia) lub w supernatancie (w przypadku wirowania). nierozpuszczalne składniki (osady) należy odrzucić. Do tak otrzymanego roztworu kwasów nukleinowych dodać trzykrotną objętość etanolu i odstawić na 15 minut. Kwasy nukleinowe wypadają wówczas z roztworu w postaci osadu, który należy odsączyć lub odwirować i ponownie rozpuścić w 15 ml 0,1M NaOH.

Otrzymany w ten sposób preparat kwasów nukleinowych - nukleinian sodowy - należy używać do dalszych doświadczeń.

2. Rozpuszczalność kwasów nukleinowych

- a. Do 1 ml roztworu nukleinianu sodu dodawać kroplami 2M HCl. Wypada osad kwasu nukleinowego – płyn opalizuje. Do tej samej probówki dodawać kroplami 2M NaOH. Osad ulega rozpuszczeniu.
- b. Do 1 ml roztworu nukleinianu sodu dodać 2 ml etanolu. Wytrąca się osad.

3. Strącanie kwasów nukleinowych roztworami białek

Do jednej probówki wlać 1 ml nukleinianu sodu, a do drugiej 1 ml wody. Do obu probówek dodać po 2-3 krople rozcieńczonego (1:20) kwasu octowego oraz po 1 ml rozcieńczonej (1:10) surowicy. Zaobserwować wytrącanie się osadu w probówce zawierającej kwas nukleinowy. Następnie do obu probówek dodać po 2 ml nasyconego roztworu NaCl. Zaobserwować rozpuszczanie się osadu w probówce ze sztuczną nukleoproteiną (powstałą po dodaniu surowicy), podczas gdy w probówce zawierającej wyłącznie białko wytrąca się osad.

4. Strącanie kwasów nukleinowych błękitem metylenowym

Do 1 ml nukleinianu sodu dodać 2-3 krople rozcieńczonego (1:20) kwasu octowego, a następnie dodać kilka kropel 1% błękitu metylenowego. W probówce wypada barwna sól zasadowego barwnika i kwasu nukleinowego.

5. Wykrywanie składników cukrowych kwasów nukleinowych

a. ogólny odczyn na cukry - próba z α -naftolem

Do 1 ml nukleinianu sodu dodać kroplę 10% alkoholowego roztworu α -naftolu, a następnie dodać ostrożnie, po ściance pochylonej probówki, 0,5 ml stężonego H_2SO_4 tak, aby „podwarstwić” nim płyn. Na granicy faz powstaje czerwono-fioletowa warstwa, rozszerzająca się na cały roztwór po delikatnym wymieszaniu.

b. wykrywanie rybozy - próba z orcyną

Do 1 ml nukleinianu sodu dodać 1 ml odczynnika orcynowego (orcyna z $FeCl_3$ w stężonym HCl), wymieszać i wstawić na 20 minut do wrzącej łaźni wodnej. Powstaje zielone zabarwienie.

c. wykrywanie deoksyrybozy - próba z difenylaminą

Do 1 ml nukleinianu sodu dodać 2 ml odczynnika zawierającego difenylaminę (w mieszaninie stężonego kwasu octowego i siarkowego). Wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 10 minut. Powstaje niebieskie zabarwienie.

6. Wykrywanie fosforanu

Do probówki wlać 5 kropli nukleinianu sodu lub hydrolizatu (z p. 7a), 2 ml wody destylowanej, 1,5 ml 10% kwasu trichlorooctowego (TCA), 0,5 ml odczynnika molibdenowego oraz 0,5 ml odczynnika z eikonogenem (w podanej kolejności) i dokładnie wymieszać. Zaobserwować pojawienie się niebieskiego zabarwienia, charakterystycznego dla obecności anionów fosforanowych.

7. Wykrywanie zasad purynowych w hydrolizatach kwasów nukleinowych

a. hydroliza kwasów nukleinowych

Pobrać do probówki 4 ml nukleinianu sodu, dodać 1 ml 2,5M roztworu H_2SO_4 i wymieszać. Wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 1 godzinę. Hydrolizat ochłodzić i ostrożnie zobojętnić (pod kontrolą papierka lakmusowego) dodając kroplami 2M roztwór NaOH, do oddziaływania słabo kwaśnego.

b. wykrywanie puryn - przez wytrącanie jonami Cu^+

Pobrać do probówki 1 ml hydrolizatu i ogrzać do wrzenia. Dodać kilka kropeł roztworu $CuSO_4$ (niebieski), a następnie dodawać kroplami nasycony roztwór $NaHSO_3$ (redukujący jon Cu^{2+} do jonu Cu^+). Wytrąca się żółto-biały osad nierozpuszczalnego kompleksu puryn z miedzią. Powtórzyć doświadczenie używając wody zamiast hydrolizatu kwasu nukleinowego. Po kilku minutach zaobserwować różnice.

c. wykrywanie puryn - przez wytrącanie jonami Ag^+

Pobrać do probówki 1 ml hydrolizatu i dodać kilka kropeł amoniakalnego roztworu $AgNO_3$ oraz 1 ml roztworu NH_4OH . Po kilku minutach wypada osad będący kompleksem puryn z jonami Ag^+ . Powtórzyć doświadczenie używając wody zamiast hydrolizatu kwasu nukleinowego. Osad nie powstanie.

8. Kwas moczowy – niektóre właściwości

a. wykrywanie kwasu moczowego - próba mureksydowa

Do małej parowniczkii dodać 1 ml moczanu disodowego oraz kilka kropeł kwasu azotowego (V). Odparować do sucha. Powstaje czerwony osad kwasu mureksydowego. Na jeden brzeg osadu nanieść kroplę roztworu NH_4OH - powstaje mureksyd amonowy barwy purpurowej. Na drugi brzeg osadu nanieść kroplę roztworu NaOH - powstaje mureksyd sodowy barwy niebieskiej.

b. rozpuszczalność soli kwasu moczowego

Do czterech probówek wlać po 1 ml roztworu moczanu disodowego. Do pierwszej dodać kroplami 2M roztwór HCl, do drugiej - NH_4Cl , do trzeciej probówki $CuSO_4$, a do ostatniej $AgNO_3$. Rozpuszczalny moczan disodowy

przechodzi w źle rozpuszczalne lub nierozpuszczalne produkty, wypadające z roztworu w postaci osadu (odpowiednio kwas moczowy oraz jego sole amonowe, miedziowe i srebrowe).

c. wykazanie właściwości redukujących kwasu moczowego

Do 1 ml roztworu moczanu disodowego dodać 0,5 ml odczynnika Folina, zawierającego wolframian sodowy w kwasie fosforowym. Próbę zalkalizować dodając 0,5 ml 2M NaOH. W obecności kwasu moczowego powstają niebieskie tlenki wolframu ($WO_2 \times 3WO_3$).

Z a d a n i e

Zbadać, czy dany roztwór zawiera rybozę, deoksyrybozę czy kwas moczowy.

Węglowodany

Cel ćwiczenia: poznanie niektórych właściwości cukrów prostych i złożonych

Węglowodany (cukry, sacharydy) są związkami o charakterze aldehydoalkoholi lub ketoalkoholi wielowodorotlenowych. **Monosacharydy**, czyli cukry proste, mogą być klasyfikowane według różnych kryteriów, jak np.: liczba atomów węgla w cząsteczce, charakter grup czynnych, czy budowa pierścienia. W organizmie człowieka występują przede wszystkim cukry zawierające od trzech do siedmiu atomów węgla. Najobficiej występują heksozy, wśród nich **glukoza**, która jest głównym monosacharydem spożywanym i przetwarzanym w organizmie ludzkim. Połączenie dwóch heksoz wiązaniem glikozydowym powoduje powstanie disacharydu. Dłuższe łańcuchy, złożone z 3-10 jednostek monosacharydowych, noszą nazwę oligosacharydów. **Polisacharydy** zawierają zwykle setki lub tysiące jednostek monosacharydowych. Dzielą się one na **homopolisacharydy** (*homoglikany*), złożone z jednakowych jednostek cukrowych (skrobia, glikogen, celuloza) i **heteropolisacharydy** (*heteroglikany*), złożone z różnych jednostek cukrowych i niecukrowych (*glikoaminoglikany*).

Cukry proste, a głównie heksozy, podlegają w tkankach różnym modyfikacjom, w wyniku których powstają takie pochodne, jak: glikozydy, aminoheksozy, kwasy uronowe i kwasy sjałowe.

Obecność grup **aldehydowych** lub **ketonowych** oraz grup **hydroksylowych** sprawia, iż cukry wykazują reakcje charakterystyczne dla aldehydów/ketonów i alkoholi.

Na szczególną uwagę zasługują **właściwości oksydoredukcyjne** cukrów. Mogą one łatwo utleniać się do odpowiednich kwasów aldonowych, kosztem redukcji czynnika utleniającego. Grupa aldehydowa utlenia się do grupy karboksylowej. Cukier przekształca się w odpowiedni kwas aldonowy, np. glukoza w kwas glukonowy, galaktoza w kwas galaktonowy. Utlenianie grupy $-CH_2OH$ na przeciwstawnym końcu cząsteczki prowadzi do przekształcenia cukru w odpowiedni kwas uronowy. Glukoza przekształca się w kwas glukuronowy, a galaktoza w kwas galakturonowy.

Jeżeli tlen grupy aldehydowej nie jest związany z żadną inną strukturą, to cukier wykazuje właściwości **redukujące**. Może np. redukować kationy metali; np. Cu^{2+} do Cu^+ , Ag^+ do Ag^0 . Próby redukcyjne wprawdzie nie są swoiste dla węglowodanów, jednak mają duże znaczenie praktyczne. Pozwalają stwierdzić, czy odpowiedzialna za tę reakcję grupa aldehydowa jest wolna czy związana. Były i nadal (choć w mniejszym stopniu) są stosowane zarówno do wykrywania cukrów, jak i do pomiaru ich stężeń w płynach biologicznych. Obecnie próby redukcyjne są coraz częściej zastępowane przez metody bardziej swoiste, w tym enzymatyczne, które pozwalają na identyfikację poszczególnych cukrów i bardziej dokładny pomiar zawartości każdego z nich.

W próbie Fehlinga i Benedicta wodorotlenek miedzi - $\text{Cu}(\text{OH})_2$, zawierający Cu (II), barwy niebieskiej, ulega redukcji do pomarańczowego tlenku miedzi - Cu_2O , zawierającego Cu (I). Powstające związki miedzi Cu (I), łatwo wytrącają się w postaci osadów nierozpuszczalnych w środowisku reakcji. Ich ponowne rozpuszczenie jest możliwe poprzez dodanie związków zawierających grupy wodorotlenowe, takich jak: winian sodowo-potasowy (w odczynniku Fehlinga), lub cytrynian sodu (w odczynniku Benedicta).

Większość disacharydów (np. maltoza, izomaltoza, laktoza) zachowuje właściwości redukujące. **Sacharoza** jest natomiast cukrem nieredukującym ponieważ grupy redukujące obydwu cukrów składowych uczestniczą w tworzeniu wiązania glikozydowego. Podobne spostrzeżenie dotyczy wszystkich polisacharydów (z wyjątkiem ich końca redukującego). Hydroliza polisacharydów uwalnia grupy redukujące, dlatego też produkty hydrolizy wykazują takie właściwości. Wprawdzie ketony, w odróżnieniu od aldehydów, nie wykazują odczynów redukcyjnych, jednak w środowisku alkalicznym ketozy izomeryzują do aldoz - np. fruktoza (*ketoza*) izomeryzuje do glukozy (*aldoza*) - dlatego ketozy są także cukrami redukującymi.

Pod działaniem stężonych kwasów cukry ulegają **dehydratacji** (odwodnieniu). Pentozy przechodzą w furfural, a heksozy w hydroksymetylenofurfural. Związki te tworzą barwne połączenia z α -naftolem lub tymolem.

W obecności stężonego kwasu siarkowego lub solnego oraz rezorcyny heksozy tworzą produkt barwy łososiowej lub czerwonej. W tych samych warunkach pentozy z orcyną tworzą produkt barwy zielonej. Inne cukry dają

zabarwienie żółte lub czerwone. Na podstawie powyższych prób można odróżnić heksozy do pentoz.

Stosując odczynnik Seliwanowa (roztwór rezorcyny w kwasie solnym) można wykryć obecność **fruktozy**. Próba ta jest charakterystyczna dla fruktozy tylko wtedy, gdy wypada dodatnio podczas ogrzewania trwającego nie dłużej niż 30 sekund. Powstaje zabarwienie łososiowe lub czerwone. Przy dłuższym ogrzewaniu podobną reakcję daje również glukoza.

Skrobia jest polisacharydem roślinnym. Jest jednym z głównych składników pokarmu człowieka. Składa się z dwóch frakcji: **amylozy** i **amylopektyny**. Amyloza jest liniowym, nierozgałęzionym polimerem reszt glukozy, zespolonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. Amylopektyna zawiera dodatkowo rozgałęzienia, w których występują wiązania α -1,6.

Glikogen – polisacharyd zwierzęcy - jest zbudowany podobnie jak amylopektyna, charakteryzuje się jednak wyższym stopniem rozgałęzienia.

Oba polisacharydy w reakcji z jodem tworzą barwne produkty. W reakcji tej amyloza daje produkt barwy niebieskiej, amylopektyna - barwy fioletowej, a glikogen - barwy brunatno-czerwonej. Niebieska barwa jest charakterystyczna dla długich, spiralnie skręconych łańcuchów bez bocznych odgałęzień. W miarę ich skracania wzrasta zabarwienie czerwone. Produkty degradacji skrobi (dekstryny) o długich łańcuchach (amylodekstryny) barwią się na kolor niebiesko-fioletowy. Produkty o średniej długości łańcucha (erytrodekstryny) barwią się na czerwono, a krótkie łańcuchy (achromodekstryny) nie barwią się jodem.

Cząsteczki skrobi zawarte w kleiku skrobiowym są otoczone płaszczem wodnym. Dodanie substancji wiążących wodę (np. siarczanu amonu) powoduje wypadanie skrobi z roztworu.

Drożdże piekarskie łatwo **fermentują** glukozę, fruktozę, maltozę i sacharozę, natomiast nie fermentują laktozy. Produktami końcowymi tego procesu są: etanol i dwutlenek węgla. Ten ostatni, jako produkt gazowy uwalnia się z układu reagującego i zbiera się w rurce fermentacyjnej.



Wykonanie

1. Ogólny odczyn na cukry - próba z α -naftolem

Do 1 ml roztworu glukozy dodać 2-3 krople 10% alkoholowego roztworu α -naftolu, a następnie dodawać ostrożnie, po ściance pochylonej probówki, 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego (VI) tak, aby podwarstwić nim płyn. Na granicy faz powstaje czerwono-fioletowa warstwa, rozszerzająca się na cały roztwór po ostrożnym wstrząsaniu.

Powtórzyć próbę posługując się roztworem sacharozy, kleiku skrobiowego i zawiesiną skrobi. Porównać wyniki doświadczeń.

2. Próby redukcyjne

a. próba Fehlinga

Zmieszać równe objętości (po 1 ml) odczynników Fehlinga: I i II, a następnie dodać 0,5 ml roztworu glukozy. Ogrzewać przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Tworzy się nierozpuszczalny, pomarańczowy tlenek miedzi (I), który utrzymuje się w zawiesinie dzięki tworzeniu kompleksu z winianem, obecnym w odczynniku Fehlinga (II). Powtórzyć próbę z roztworem sacharozy.

b. próba Benedicta

Do 2 ml odczynnika Benedicta dodać 10 kropeł roztworu glukozy. Ogrzewać przez około 5 minut we wrzącej łaźni wodnej, następnie ochłodzić. Powstaje pomarańczowy, nierozpuszczalny tlenek miedzi (I), który utrzymuje się w zawiesinie dzięki tworzeniu kompleksu z cytrynianem, obecnym w odczynniku Benedicta. Powtórzyć próbę z roztworem sacharozy.

3. Fermentacja glukozy

Kawałek drożdży piekarskich, wielkości dużej fasoli, rozetrzeć z 20 ml 10% roztworu glukozy. Powstanie zawiesina. Przebrać płyn przebrać do rurki fermentacyjnej i pozostawić w temperaturze pokojowej na dwie godziny. Zaobserwować proces fermentacji. Pojawia się gaz (CO_2) pod zamkniętą kopolą rurki, a jego objętość narasta w miarę postępu reakcji.

4. Próba na fruktozę

Do 2 ml odczynnika Seliwanowa dodać kilka kropeł roztworu sacharozy i płyn ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 30 sekund. Powstaje zabarwienie łososiowe lub czerwone.

5. Próba na pentozy

Do 1 ml odczynnika Biala dodać 3-4 krople roztworu pentozy i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut. Powstaje charakterystyczne zielone zabarwienie.

6. Właściwości skrobi

a. sporządzanie kleiku skrobiowego

Okolo 0,3 g (1/3 płaskiej łyżeczki) skrobi zmieszać z 5 ml zimnej wody destylowanej, a następnie przenieść tę zawiesinę do 25 ml wrzącej wody, stale mieszając. Otrzymany w ten sposób kleik skrobiowy gotować jeszcze przez 30 sekund, a następnie oziębic.

b. próba z jodem

Do 1 ml kleiku skrobiowego dodać kroplę roztworu jodu w jodku potasu (płyn Lugola). Powstaje niebieskie zabarwienie, znikające po krótkim ogrzaniu i zjawiające się ponownie po oziębieniu.

c. próby redukcyjne

Wykonać próby Fehlinga i Benedicta z kleikiem skrobiowym, w sposób opisany w punktach 2a i 2b.

d. hydroliza skrobi

Pobrać 2 ml kleiku skrobiowego, dodać 2 ml 2M HCl, ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut. Wykonać próby z odczynnikami Fehlinga i Benedicta, porównać wynik z próbami wykonanymi z kleikiem skrobiowym – niehydrolizowanym.

Z a d a n i e

1. Czy dany roztwór zawiera węglowodany; jeśli tak, to czy są to cukry redukujące?
2. Czy dany roztwór zawiera: glukozę, fruktozę, pentozę lub skrobię?

Fosfolipidy, steroidy i witaminy rozpuszczalne w tłuszczach

Cel ćwiczenia: preparatyka fosfolipidów i badanie ich składu; wykrywanie niektórych steroidów i witamin

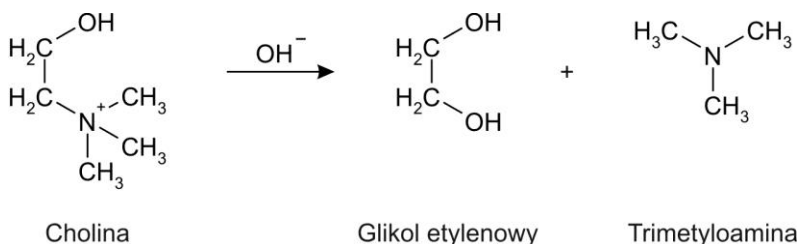
Fosfolipidy

Fosfolipidy występują we wszystkich błonach biologicznych. Są substancjami amfipatycznymi. Częsteczką każdego z nich zawiera polarną głowę i niepolarny ogon. Szkielet cząsteczki stanowi reszta **glicerolu** lub bardziej złożonego alkoholu - **sfingozyiny**. Powtarzalnym elementem strukturalnym wszystkich fosfolipidów zawierających glicerol - zwanych glicerofosfolipidami - jest **kwasy fosfatydowy**.

Jednym z glicerofosfolipidów jest **fosfatydylocholina** (lecytyna), której cząsteczka obok glicerolu zawiera dwa łańcuchy kwasów tłuszczowych, fosforan oraz cholinę. Lecytyna jest najobficiej występującym fosfolipidem w komórkach eukariotycznych, występuje także w żółtku jaja kurzego. Można ją łatwo wyekstrahować mieszaniną chloroformu z metanolem, w stosunku 2:1. Lecytyna trudno rozpuszcza się w bezwodnym acetonie.

Lecytyna nie rozpuszcza się w wodzie, lecz dzięki obecności hydrofilowej grupy fosfocholinowej tworzy w niej trwałą, mętną zawiesinę. Dobrze rozpuszcza się w chloroformie. Podczas ogrzewania lecytyny dochodzi do odwodnienia cząsteczki glicerolu. Powstaje nienasycony aldehyd - **akroleina** - substancja o przykrym, drażniącym zapachu. Można ją wykazać jedną z prób redukcyjnych, np. z chromianem (VI). Akroleina redukuje chromian (VI) potasu (kolor pomarańczowy) do chromianu (IV) potasu (kolor zielony).

W oddziaływaniu silnie zasadowym dochodzi do hydrolizy wiązania estrowego pomiędzy choliną a resztą fosforanową lecytyny. Uwolniona **cholina** ulega rozkładowi do **glikolu etylenowego** i **trimetyloaminy**, która wykazuje charakterystyczną woń (rycina poniżej).



Hydroliza zasadowa uwalnia kwasy tłuszczowe w postaci soli potasowych (mydeł), które zmniejszają napięcie powierzchniowe wody. Fosforan, zawarty w lecytynie, uwalnia się podczas hydrolizy zasadowej. W reakcji z molibdenianem (VI) amonu tworzy fosfomolibdenian amonu, który barwi roztwór na żółto.

Steroidy

Steroidy są pochodnymi **cyklopentanoperhydrofenantrenu**. Najczęściej występującymi przedstawicielami steroidów są alkohole, zwane sterolami, posiadające grupę hydroksylową przy węglu C-3, a wśród których dominuje **cholesterol**. Jest on substratem, z którego powstaje większość innych związków steroidowych. Do nich należą przede wszystkim: kwasy żółciowe i hormony steroidowe. Witamina D₃ powstaje z 7-dehydrocholesterolu – prekursora cholesterolu.

Cholesterol jest przedstawicielem steroli zwierzęcych. Jest syntetyzowany prawie przez wszystkie narządy, jednak najobficiej powstaje w wątrobie i w ścianie jelit. Dominuje w błonach komórkowych i lipoproteinach osocza krwi. Cholesterol, dzięki obecności wiązania podwójnego, w obecności mocnych kwasów tworzy barwne produkty. Pod wpływem stężonego H₂SO₄ (próba Salkowskiego) dochodzi do odłączenia cząsteczek wody. Powstaje czerwony kwas disulfonowy bicholestadienu, który w obecności bezwodnika kwasu octowego (próba Liebermana-Burcharda) tworzy zielono zabarwiony kwas monosulfonowy bicholestadienu. Ślady wody uniemożliwiają przebieg reakcji.

Najobficiej występującymi **kwasami żółciowymi** są: kwas cholowy i kwas deoksycholowy, w mniejszej ilości - kwasy litocholowy i kwas chenodeoksycholowy. Obecność polarnych grup karboksylowych i hydroksylowych nadaje kwasom żółciowym, jako jedynej grupie lipidów,

rozpuszczalność w środowisku wodnym. Kwasy żółciowe mają charakter **amfipatyczny**. Ich grupy hydroksylowe są skierowane na jedną stronę płaszczyzny pierścienia, a grupy metylowe na drugą. Dlatego cząsteczka kwasu żółciowego ma stronę niepolarną, skierowaną ku fazie tłuszczowej i stronę polarną, skierowaną ku fazie wodnej. Dzięki tej właściwości kwasy żółciowe pełnią funkcję emulgatorów wobec nierozpuszczalnych w wodzie triacylogliceroli i innych lipidów. Zwiększają stopień dyspersji tłuszczów w treści jelitowej, zwiększając przez to dostępność enzymów do substratu lipidowego.

Część kwasów żółciowych tworzy połączenia z glicyną lub tauryną - ich sole są bardziej efektywnymi emulgatorami niż wolne kwasy żółciowe. Ponadto kwasy żółciowe wiążą się z cholesterolem umożliwiając mu rozpuszczalność w żółci i wydalanie z wątroby poprzez żółć.

Obniżenie **napięcia powierzchniowego** przez kwasy żółciowe obecne w roztworze wodnym można stwierdzić przez opadanie na dno probówki siarki koloidalnej (*kwiat siarkowy*) oraz przez powstawanie trwałej zawiesiny (emulsji) oliwy w wodzie. Kwasy żółciowe, jako związki pierścieniowe mające kilka grup -OH, zachowują się podobnie do rezorcyny lub α -naftolu. Ulegają kondensacji z hydroksymetylenofurfurałem, powstającym podczas działania stężonego kwasu siarkowego na sacharozę. Wytwarza się czerwono zabarwiony produkt kondensacji, świadczący o obecności kwasów żółciowych.

Do witamin D należą przede wszystkim: **ergokalcyferol** (witamina D₂) oraz **cholekalcyferol** (witamina D₃). Prowitaminami witaminy D są nienasycone sterole. Obie formy witaminy D powstają w skórze pod wpływem promieniowania ultrafioletowego. Aktywną formą witaminy D₃ jest kalcytriol.

Witaminy A posiadają strukturę **izoprenową**. Występują wyłącznie w tkankach zwierzęcych w dwóch postaciach: **retinolu 1** (witamina A₁) i **retinolu 2** (witamina A₂). Obie są alkoholami 20-węglowymi, zawierającymi sześciocłonowy pierścień beta-jononu z trzema grupami metylowymi i z łańcuchem bocznym, zawierającym dwie jednostki izoprenowe. Formy alkoholowe witaminy A (retinole) ulegają w organizmie utlenieniu do odpowiednich aldehydów (retinale), a te utleniają się do odpowiednich kwasów retinowych. Rośliny zawierają grupę substancji, zwanych karotenami, które są 40-węglowymi, wielonienasyconymi pochodnymi izoprenu, zawierającymi pierścień jononu. Karoteny: α , β i γ pełnią rolę prowitamin A

dla organizmów zwierzęcych. Z uwagi na zawartość dużej liczby sprzężonych wiązań podwójnych karoteny są związkami barwnymi.

Obecność sprzężonych podwójnych wiązań, zarówno w strukturze witaminy A, jak i D₃ sprawia, iż substancje te wykazują charakterystyczne reakcje barwne z chlorkiem antymonu (SbCl₃). Z witaminą A₁ powstaje produkt barwy niebieskiej, a z witaminą D₃ - produkt barwy fioletowo-czerwonej.

W y k o n a n i e

1. Ekstrakcja lecytyny z żółtka jaja kurzego

Okolo 2-3 g suszonego żółtka jaja kurzego (płaska łyżeczka) rozcierać w moździerzu przez 2-3 minuty z 10 ml rozpuszczalnika, składającego się z chloroformu i metanolu w stosunku 2:1. Ekstrakt przesączyć do suchej probówki przez sączek z bibuły, zwilżonej uprzednio rozpuszczalnikiem. Przesącz odparować we wrzącej łaźni wodnej. Na ściankach probówki pozostaje brunatna, oleista substancja, która po ochłodzeniu przyjmuje konsystencję wazeliny. Jest to lecytyna, zanieczyszczona innymi składnikami żółtka.

2. Rozpuszczalność lecytyny

Do dwóch probówek przenieść bagietką po szczypcie lecytyny. Do jednej z nich dodać 1-2 ml H₂O i ogrzać przez kilka sekund we wrzącej łaźni wodnej. Zaobserwować mętną zawiesinę. Do drugiej probówki dodać 1 ml chloroformu i podobnie ogrzać w łaźni wodnej. Lecytyna rozpuszcza się w chloroformie. Dodać 2 ml acetonu - wytrąca się osad lecytyny.

Próby z chloroformem należy zlewać do specjalnego naczynia.

3. Skład chemiczny lecytyny

a. wykazanie obecności glicerolu - próba akroleinowa

Do suchej probówki przenieść 2-3 krople lecytyny, dodać 1,5 ml roztworu chromianu (VI) potasu ($K_2Cr_2O_7$) oraz 3-4 krople stężonego kwasu siarkowego. Tak przygotowaną próbę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut. Zaobserwować zmianę zabarwienia roztworu.

b. wykazanie obecności kwasów tłuszczowych - reakcja zmydlania

Do szczypty lecytyny w probówce dodać 3 ml 10% alkoholowego roztworu KOH i mieszaninę ogrzewać przez kilka minut we wrzącej łaźni wodnej. Następnie dodać 5 ml wody destylowanej i wstrząsnąć probówką. Roztwór pieni się.

c. wykazanie obecności choliny

Do probówki ze szczyptą lecytyny dodać 2 ml 20% NaOH i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut – zaobserwować charakterystyczną woń produktu reakcji.

d. wykazanie obecności fosforu

Do probówki ze szczyptą lecytyny dodać 0,5 ml 20% NaOH i ogrzewać przez 2 minuty we wrzącej łaźni wodnej. Następnie dodać 1 ml roztworu molibdenianu (VI) amonu. Zaobserwować barwę roztworu.

4. Wykrywanie cholesterolu

a. reakcja Salkowskiego

Do suchej probówki dodać 0,5 ml chloroformowego roztworu cholesterolu, a następnie ostrożnie, po ściance dodać (podwarstwić) 0,5 ml stężonego H_2SO_4 . Warstwa chloroformowa barwi się na czerwono, a kwas siarkowy fluoryzuje na zielono.

b. reakcja Liebermana-Burcharda

Do suchej probówki dodać 1 ml chloroformowego roztworu cholesterolu, 3 krople bezwodnika kwasu octowego i ostrożnie 2 krople

stężonego H_2SO_4 . Płyn zabarwia się na czerwono, następnie przyjmuje barwę niebieską, a wreszcie zieloną.

5. Wykrywanie kwasów żółciowych

W 1 ml roztworu żółci rozpuścić kilka kryształków sacharozy. Następnie podwarstwić roztwór 1 ml stężonego H_2SO_4 (dodając kwas siarkowy po ściance probówki). Zaobserwować powstanie czerwonego pierścienia na granicy warstw.

6. Obniżanie napięcia powierzchniowego przez kwasy żółciowe

Do dwóch probówek wlać po 3 ml wody. Do jednej z nich dodać 2–3 krople żółci, a następnie do obu probówek wsypać niewielką ilość siarki koloidalnej. Porównać szybkość opadania siarki.

7. Wykrywanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Do suchej probówki dodać 1 ml nasyconego chloroformowego roztworu chlorku antymonu (SbCl_3) oraz 2-3 krople farmakologicznego preparatu witamin A i D_3 . Po zmieszaniu powstaje niebieskie zabarwienie świadczące o obecności witaminy A, które szybko przechodzi w fioletowo-czerwone, związane z obecnością witaminy D_3 .

Próby zawierające chloroform (p. 4a, 4b i 7) należy zlewać do specjalnego pojemnika.

Z a d a n i e

Zbadać, czy roztwór zawiera cholesterol lub kwasy żółciowe.

Enzymy

Cel ćwiczenia: poznanie niektórych właściwości enzymów

Niemal wszystkie reakcje biochemiczne wymagają udziału katalizatorów biologicznych (biokatalizatorów), zwanych **enzymami**. Substancja przekształcana przez enzym nosi nazwę **substratu**, a substancja powstająca w wyniku przekształcenia substratu nosi nazwę **produktu**. Enzym nie zużywa się w trakcie katalizowanej przez siebie reakcji, dzięki czemu jedna cząsteczka enzymu uczestniczy w przekształceniu wielu cząsteczek substratu.

Wpływ enzymu na prędkość reakcji

Enzymy przyspieszają przebieg reakcji chemicznych w organizmie, co najmniej milion razy. Przy braku enzymów większość reakcji chemicznych zachodzi tak wolno, iż są one praktycznie niezauważalne. Można to wykazać w doświadczeniu z udziałem **trombiny**. Jest to enzym proteolityczny, przekształcający rozpuszczalny fibrynogen osocza krwi w monomer fibryny, który samoistnie polimeryzuje tworząc nierozpuszczalną fibrynę. Reakcja ta ma podstawowe znaczenie w procesie krzepnięcia krwi. W próbówce bez *trombiny* fibrynogen nie polimeryzuje w okresie obserwacji, a w próbówce zawierającej *trombinę* krzepnie po kilkunastu sekundach.

Inaktywacja termiczna enzymów

Enzymy ulegając denaturacji termicznej tracą zdolność katalizowania reakcji. Można to wykazać na przykładzie **trombiny** oraz enzymów katalizujących proces fermentacji alkoholowej.

Inaktywacja termiczna *trombiny* uniemożliwia powstanie skrzepu – przejście rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę.

Drożdże zawierają zestaw enzymów katalizujących proces fermentacji alkoholowej cukrów. Podczas fermentacji powstaje etanol i CO₂. Ten ostatni, jako produkt gazowy uwalnia się z układu reagującego i zbiera się w rurce fermentacyjnej. Inaktywacja termiczna drożdży uniemożliwia fermentację.

Wpływ pH na działanie enzymów

Zmiana stężenia jonów wodorowych w środowisku zmienia ładunek elektryczny białka enzymatycznego. Powoduje to zmiany właściwości chemicznych i fizycznych enzymu. Z tego powodu każdy enzym wykazuje maksymalną aktywność w ściśle określonym zakresie pH (optimum pH).

Pepsyna powoduje hydrolityczny rozpad wiązań peptydowych w białkach. Jej działanie można łatwo wykazać przez zastosowanie nierozpuszczalnego, sztucznie zabarwionego substratu białkowego - włókniaka. W wyniku jego hydrolizy powstają krótkie peptydy, które wraz ze związanym barwnikiem przechodzą do roztworu, powodując jego zabarwienie.

Skrobia barwi się jodem (płynem Lugola) i nie wykazuje właściwości redukujących. **Amylaza** powoduje hydrolityczny rozpad wiązań glikozydowych w skrobi. Pod działaniem tego enzymu skrobia rozpada się na maltozę i krótkie oligosacharydy. Postęp reakcji hydrolizy skrobi można łatwo wykazać przy pomocy reakcji z jodem oraz prób redukcyjnych. W wyniku hydrolizy skrobi pojawiają się produkty niereagujące z jodem, a wykazujące zdolności redukujące. Ta ostatnia właściwość jest efektem uwolnienia grup aldehydowych w wyniku rozpadu wiązań glikozydowych.

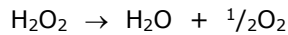
Wpływ aktywatorów na aktywność enzymów

Wpływ aktywatorów na aktywność enzymów można wykazać na przykładzie **tromboplastyny osoczowej** (kompleks osoczowych czynników krzepnięcia krwi – V, X oraz fosfolipidów płytek krwi). Jon wapniowy (Ca^{2+}) jest aktywatorem tego enzymu. *Tromboplastyna osoczowa* powoduje przejście nieczynnej *protrombiny* w czynną *trombinę*, która z kolei przekształca rozpuszczalny fibrynogen w nierozpuszczalną fibrynę. W obecności cytrynianu sodu kationy Ca^{2+} są wiązane przez aniony cytrynianowe, tworząc słabo dysocjujący cytrynian wapnia. Brak jonów Ca^{2+} uniemożliwia powstanie aktywnej *tromboplastyny osoczowej*, a w konsekwencji hamuje krzepnięcie krwi. Zjawisko to wykorzystuje się w lecznictwie i w diagnostyce laboratoryjnej do przechowywania krwi w stanie płynnym.

Wpływ inhibitorów na działanie enzymów

Wpływ inhibitorów na przebieg reakcji enzymatycznych można wykazać na przykładzie działania cyjanku na **katalazę**. *Katalaza* jest

enzymem z klasy *oksydoreduktaz*, który katalizuje reakcję rozpadu nadtlenu wodoru.



Cyjanek potasu wiąże się nieodwracalnie z enzymem i pozbawia go aktywności katalitycznej.

Powszechne występowanie niektórych enzymów

Niektóre enzymy są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Należy do nich **peroksydaza** - enzym rozkładający nadtlenek wodoru. Rozkłada H_2O_2 tylko w obecności dawcy atomów wodoru np. pirogalolu, który utlenia się, zmieniając swoje zabarwienie na brązowe. We krwi ludzkiej również występują białka enzymatyczne o właściwościach peroksydacyjnych.

Wykorzystanie enzymów do celów analitycznych

Enzymy odznaczają się wielką specyficnością, dzięki temu niektóre z nich służą do wykrywania i ilościowego oznaczania, w warunkach laboratoryjnych, substancji znajdujących się w mieszaninach.

Ureaza, występująca w nasionach niektórych roślin, służy do wykrywania i ilościowego oznaczania mocznika w materiale biologicznym. Katalizuje ona rozkład mocznika do CO_2 i NH_3 . Amoniak można wykryć i oznaczyć ilościowo odczynnikiem Nesslera (zasadowy roztwór jodortęcianu (II) potasu). Odczynnik ten w obojętnym i zasadowym środowisku reaguje z jonem amonowym (NH_4^+) tworząc produkt barwy żółto-brązowej.

Wykonanie

1. Wykazanie wpływu enzymu na prędkość reakcji

Przygotować 2 probówki zawierające po 0,5 ml roztworu fibrynogeny. Do jednej z nich dodać 0,2 ml roztworu soli fizjologicznej, a do drugiej 0,2 ml roztworu *trombiny*. Zaobserwować różnice w szybkości powstawania skrzepu.

2. Inaktywacja termiczna enzymów

a. inaktywacja enzymów fermentacji alkoholowej

Kawałek drożdży piekarskich (wielkości dużej fasoli) rozetrzeć w 10 ml wody destylowanej. Otrzymaną zawiesinę rozdzielić na dwie równe części. Jedną z nich ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut w celu termicznej inaktywacji enzymów. Następnie do obu zawiesin dodać po około 20 ml 10% roztworu sacharozy i przenieść do rurek fermentacyjnych. Pozostawić obie rurki w temperaturze pokojowej na około 45 minut. Porównać przebieg fermentacji.

b. inaktywacja trombiny

Do dwóch probówek wlać po 0,2 ml roztworu *trombiny*. Zawartość jednej z nich ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut. Następuje denaturacja termiczna białka enzymatycznego. Do obu probówek dodać po 1 ml osocza krwi i wstawić do łaźni wodnej o temp. 37°C na 5 minut. Zaobserwować różnice w pojawianiu się skrzepu.

3. Wpływ pH na działanie enzymów

Przygotować dwa rzędy probówek (po 4 probówki w każdym) i ponumerować je w każdym rzędzie od 1 do 4. Do poszczególnych probówek wlać kolejno po 2 ml następujących roztworów, o różnym pH:

probówka Nr 1 - 0,1M kwas solny - pH 1,0
probówka Nr 2 - 0,1% kwas mlekowy - pH 5,0
probówka Nr 3 - woda destylowana - pH 7,0
probówka Nr 4 - 1% węglan sodu - pH 9,0

Do probówek pierwszego rzędu dodać po 2-3 krople roztworu *pepsyny* i 3-4 „kłaczkii” włóknika zabarwionego czerwienią Kongo. Do probówek drugiego rzędu dodać po 1 ml kleiku skrobiowego i po 2 ml roztworu *amylazy*.

Wszystkie probówki wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 20 minut. Zaobserwować, który z roztworów zawierających włóknik i *pepsynę* zabarwił się.

Do każdej probówki (drugiego rzędu) zawierającej skrobię i *amylazę* wrzucić po kawałeczku uniwersalnego papierka lakmusowego. Ciągłe

mieszając, dodawać kroplami rozcieńczony NaOH (probówka 1 i 2) lub HCl (probówka 4) - doprowadzić płyny do oddziaływania obojętnego kierując się barwą papierka. Następnie zawartość każdej probówki rozdzielić na dwie części (**A** i **B**).

Roztwory **A** poddać próbie na obecność skrobi, dodając 2-3 krople płynu Lugola. Z roztworami **B** wykonać próbę redukcyjną (Benedicta), opisaną w ćwiczeniu **Węglowodany**.

Zaobserwować zależność aktywności badanych enzymów od pH roztworu. Ustalić w przybliżeniu optimum pH dla obydwu badanych enzymów. Wyniki zestawzić w Tabeli, zaznaczając efekty reakcji (w zależności od ich natężenia) odpowiednią liczbą plusów.

Probówka	1	2	3	4
pH	1,0	5,0	7,0	9,0
Pepsyna				
Amylaza				

4. Wpływ jonów wapniowych na aktywność tromboplastyny osoczowej

Do dwóch probówek wlać po 0,1 ml 0,025M CaCl₂. Do jednej z nich dodać 0,1 ml 0,2M cytrynianu sodu, a do drugiej 0,1 ml wody destylowanej. Do obydwu probówek dodać po 0,5 ml osocza krwi i wstawić je do łaźni wodnej o temperaturze 37°C, na 10 minut. Zaobserwować różnicę w powstawaniu skrzepu.

5. Wpływ cyjanku na aktywność katalazy

Do trzech probówek dodać po 5-6 kropel krwi. Jedną z nich wstawić do wrzącej łaźni wodnej na kilka minut, następnie ochłodzić. Do drugiej dodać 2-3 krople roztworu cyjanku potasu. Następnie do wszystkich trzech probówek dodać po 1 ml nadtlenku wodoru. Porównać różnicę w pienieniu się roztworu.

6. Powszechne występowanie właściwości peroksydacyjnych

a. wykazanie obecności peroksydazy w soku ziemniaczanym

Do 1 ml świeżego soku ziemniaczanego dodać 10 kropeł roztworu pirogalolu oraz 10 kropeł roztworu nadtlenu wodoru. Pojawienie się brunatnego zabarwienia roztworu po 2-3 minutach świadczy o obecności enzymu.

b. wykazanie peroksydacyjnych właściwości krwi

Do 2,5 ml krwi dodać 10 kropeł roztworu pirogalolu oraz 10 kropeł roztworu nadtlenu wodoru. Brunatne zabarwienie pojawiające się po paru minutach świadczy o właściwościach peroksydacyjnych krwi.

7. Wykorzystanie ureazy do celów analitycznych

Do dwóch próbek wlać po 0,5 ml roztworu *ureazy*. Jedną z nich ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut, a następnie ochłodzić. Do obu próbek dodać po 1 ml roztworu mocznika, odstawić na 15 minut w temperaturze pokojowej, a później dodać do każdej z nich po 3-4 krople odczynnika Nesslera. Porównać wyniki w obu próbach.

Z a d a n i e

Wykazać, czy badany płyn posiada aktywność *katalazy/peroksydazy* lub czy zawiera mocznik.

Enzymy przewodu pokarmowego

Cel ćwiczenia: poznanie niektórych właściwości soków trawiennych

Spożyte pokarmy ulegają przemianie w przewodzie pokarmowym pod wpływem enzymów zawartych w sokach trawiennych. Tabela podaje przybliżone objętości soków trawiennych wydzielanych w ciągu doby.

Sok trawienny	Objętość[l]
Ślina	1,5
Sok żołądkowy	2,5
Sok trzustkowy	0,5
Żółć	0,5
Sok jelitowy	3,0

Istotą trawienia jest przemiana złożonych składników pokarmowych (białek, polisacharydów, tłuszczów – głównie acylogliceroli) w produkty prostsze (aminokwasy, monosacharydy, kwasy tłuszczowe), które mogą ulec absorpcji do krwioobiegu i zużycowaniu przez tkanki. Trawienie rozpoczyna się w jamie ustnej i w żołądku, a kończy się w jelicie cienkim.

Ślina

Trzy pary dużych ślinianek oraz drobne gruczoły ślinowe wydzielają ślinę, która jako pierwszy sok trawienny wchodzi w kontakt ze spożytymi pokarmami. Ślina zawiera około 1% substancji stałych. Są to głównie białka, proteoglikany, glikoproteiny oraz elektrolity. Jedynym enzymem śliny, mającym znaczenie w procesie trawienia, jest ***α -amylaza***, katalizująca

wstępną degradację skrobi. Aktywność katalityczna tego enzymu uwarunkowana jest obecnością jonów chlorkowych (Cl^-).

Sok żołądkowy

Głównymi składnikami soku żołądkowego są: **kwas solny, pepsyna** oraz **śluz** chroniący błonę śluzową. Kwas solny stwarza kwaśne środowisko (pH około 1), optymalne dla działania *pepsyny*, a ponadto denaturuje białka pokarmowe, zwiększając ich podatność na proteolizę. Aktywna *pepsyna* powstaje przez proteolityczną modyfikację nieaktywnego prekursora - pepsynogenu. W procesie jego aktywacji uczestniczy HCl i aktywna *pepsyna*. *Pepsyna* rozkłada wiązania peptydowe pomiędzy waliną i leucyną oraz wiązania powstałe z udziałem grup aminowych aminokwasów aromatycznych i kwaśnych.

Pod działaniem **pepsyny** nierozpuszczalny substrat białkowy (a w warunkach laboratoryjnych - zabarwiony włóknik) rozpada się do drobnocząsteczkowych, rozpuszczalnych produktów, które wraz z barwnikiem przechodzą do roztworu.

Sok żołądkowy zawiera wolny kwas solny w stężeniu około 0,1M (*kwasowość wolna*), co odpowiada pH 1. Oprócz wolnego HCl sok żołądkowy zawiera szereg substancji o charakterze słabych kwasów. Są to głównie kwaśne białka oraz sole białek z kwasem solnym (*kwasowość związana*). Suma kwasowości wolnej i związanej daje wartość zwaną *kwasowością całkowitą*. Podczas miareczkowania treści żołądkowej 0,1M NaOH, w reakcję zobojętniania wchodzi najpierw cząsteczki wolnego HCl, a dopiero w następnej kolejności słabe kwasy.

Kwasowość wolną wyrażamy liczbą mililitrów 0,1M NaOH potrzebnych do związania wolnego HCl, zawartego w 100 ml treści żołądkowej (doprowadzenie pH do 3,0). **Kwasowość całkowitą** wyrażamy liczbą mililitrów 0,1M NaOH, potrzebnych do całkowitego zobojętnienia wszystkich kwasów, zawartych w 100 ml treści żołądkowej (doprowadzenie pH do 9,0). U zdrowych ludzi (na czczo) kwasowość wolna nie przekracza 20 ml, a kwasowość całkowita 30 ml 0,1M NaOH.

Jeżeli wskutek jakichkolwiek przyczyn treść żołądkowa nie zawiera wolnego HCl, powstają dogodne warunki do rozwoju **bakterii**. Efektem ich działania jest pojawienie się w treści żołądkowej produktów metabolizmu

bakteryjnego, głównie kwasu mlekowego. Kwas mlekowy w patologicznym soku żołądkowym w obecności roztworu fenolu i FeCl_3 przechodzi w kanarkowo-żółty mleczan żelaza (III).

Sok trzustkowy i jelitowy

W dwunastnicy treść pokarmowa styka się z wydzieliną dwóch wielkich gruczołów przewodu pokarmowego: trzustki i wątroby. Głównym producentem enzymów trawiennych znajdujących się w dwunastnicy jest **trzustka**. W soku trzustkowym znajdują się enzymy hydrolityczne, działające na wszystkie główne substraty pokarmowe. Są to przede wszystkim: *α -amylaza*, *lipaza*, *fosfolipaza A*, *esteraza cholesterolowa*, *rybonukleaza* i *deoksyrybonukleaza* oraz enzymy proteolityczne - *trypsyna*, *chymotrypsyna*, *elastaza* oraz *karboksypeptydazy*.

Sok trzustkowy obok enzymów zawiera szereg elektrolitów, a głównie: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i HCO_3^- . Szczególne znaczenie mają aniony wodorowęglanowe (HCO_3^-), które biorą udział w zobojętnianiu soku żołądkowego i stwarzają optymalne (alkaliczne) pH dla działania enzymów trzustkowych.

Wykrywanie obecności **enzymów proteolitycznych** w soku trzustkowym opiera się na podobnej zasadzie, jak wykrywanie obecności *pepsyny* w soku żołądkowym. Zabarwiony, nierozpuszczalny włóknik pod działaniem proteaz trzustkowych rozpada się na drobnocząsteczkowe, rozpuszczalne produkty, przechodzące wraz z barwnikiem do roztworu.

Obecność **lipazy** można wykazać używając mleka, jako źródła tłuszczu. Świeże mleko wykazuje słabo zasadowe pH. Barwi lakmus na kolor niebieski. Kwasy tłuszczowe uwolnione przez *lipazę trzustkową* zmieniają odczyn zasadowy na kwaśny - zakwaszają mleko, zmieniając barwę lakmusa z niebieskiej na czerwoną. **Amylazę trzustkową** można wykryć za pomocą skrobi, która pod wpływem tego enzymu ulega degradacji do cukrów redukujących. W próbie zawierającej skrobię i sok trzustkowy nastąpi hydroliza skrobi, a jej konsekwencją jest zanik reakcji z jodem i pojawienie się właściwości redukujących, które wykazują produkty degradacji skrobi.

Żółć, produkowana przez wątrobę, odgrywa ważną rolę w trawieniu acylogliceroli i wchłanianiu produktów lipolizy do krwioobiegu. Zawarte w niej kwasy żółciowe emulgują tłuszcze. Powstaje zawiesina tłuszczu o wysokim

stopniu dyspersji. Zwiększa to powierzchnię kontaktu tłuszczu z *lipazą trzustkową* (enzymu z substratem), co ułatwia proces lipolizy. Uwolnione kwasy tłuszczowe wiążą się z kwasami żółciowymi i w tej postaci wchłaniają się z przewodu pokarmowego. Prawidłowe trawienie i wchłanianie tłuszczów warunkuje wchłanianie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach: A, D, E i K.

Hydroksymetylenofurfural powstały z heksoz pod działaniem stężonego kwasu siarkowego (VI) reaguje z **kwasami żółciowymi**. Na pograniczu obu warstw powstaje czerwony pierścień. Kwasy żółciowe obniżają napięcie powierzchniowe, co można stwierdzić oceniając szybkość opadania na dno próbówki siarki koloidalnej (*kwiatu siarkowego*) – w próbie Haya. Można to potwierdzić dodając oliwę do wody - oliwa nie miesza się z wodą. Widoczna jest granica faz pomiędzy wodą a oliwą, a w próbówce zawierającej kwasy żółciowe powstaje trwała zawiesina (emulsja).

Sok jelitowy, produkowany przez gruczoły jelita cienkiego, zawiera szereg enzymów hydrolitycznych, kończących proces trawienia pokarmów do produktów wchłanianych. Są to przede wszystkim: *aminopeptydazy, karboksypeptydazy, fosfolipazy C i D, maltaza, izomaltaza, laktaza, sacharaza, 5'-nukleotydaza i nukleozydaza*.

Głównymi produktami końcowymi trawienia jelitowego są wolne aminokwasy, cukry proste i kwasy tłuszczowe, które wchłaniają się do krwi. Triacyloglicerole na ogół ulegają jedynie częściowej degradacji. Odłączają jedną lub dwie reszty kwasów tłuszczowych. Produkty ich rozpadu uczestniczą w resyntezie tych lipidów w ścianie jelita cienkiego i w tej postaci są wchłaniane do limfy.

Jelito grube jest już tylko miejscem, gdzie zachodzą fermentacje bakteryjne, wchłanianie wody i wydalanie niektórych soli.

W y k o n a n i e

1. Wykazanie obecności kwasów żółciowych

W 1 ml rozcieńczonego roztworu żółci rozpuścić kilka kryształków sacharozy. Podwarstwić ten roztwór 1 ml stężonego H₂SO₄ (dodając kwas

siarkowy powoli po ścianie pochylonej probówki). Na pograniczu obu warstw powstaje czerwony pierścień.

2. Właściwości kwasów żółciowych

a. próba Haya

Do dwóch probówek wlać po 3 ml wody. Do jednej z nich dodać 2–3 krople żółci, a następnie do obu probówek wsypać niewielką ilość siarki koloidalnej. Porównać szybkość opadania siarki.

b. emulgujące działanie kwasów żółciowych

Do dwóch probówek wlać po 3 ml wody destylowanej i kilka kropli oliwy. Do jednej z nich dodać kroplę żółci. Obie probówki mocno wstrząsnąć. Zaobserwować różnice.

3. Wykazanie obecności pepsyny

Do dwóch probówek dodać po 2 ml 0,1M HCl i 3-4 „kłaczkę” zabarwionego włóknika. Następnie do jednej z probówek dodać 2 ml soku żołądkowego, a do drugiej 2 ml wody. Obie probówki wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 30 minut. Po inkubacji wstrząsnąć. Porównać zabarwienie roztworów.

4. Wykazanie kwasu mlekowego w patologicznej treści żołądkowej

Do 2 ml 1% fenolu dodać dwie krople roztworu FeCl_3 . Roztwór zabarwi się na niebiesko. Do tego roztworu dodać 2 ml soku żołądkowego. Zaobserwować zmianę zabarwienia.

5. Pomiar kwasowości treści żołądkowej

Pobrać próbę soku żołądkowego (10 ml) i dodać 1 kroplę wskaźnika Topfera. Miareczkować 0,1M NaOH do wystąpienia barwy łososiowej (pH 3 – kwasowość wolna). Odczytać i zanotować objętość zużytej zasady. Miareczkować dalej, aż do pojawienia się barwy różowej (pH 9 – kwasowość całkowita).

Należy obliczyć kwasowość wolną, związaną i całkowitą mnożąc przez 10 odczytane z biurety objętości 0,1M NaOH.

6. Enzymy trzustki

a. wykazanie obecności enzymów proteolitycznych

Do dwóch probówek włożyć po 3-4 „kłaczkę” zabarwionego włókniaka i dodać po 2 ml buforu o pH 8,0. Do jednej probówki dodać 10 kropli uprzednio wymieszanego soku trzustkowego. Obie probówki wstawić na 45 minut do łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Po inkubacji wstrząsnąć. Porównać różnice w zabarwieniu roztworów.

b. wykazanie obecności lipazy

Do dwóch probówek dodać po 2 ml mleka i po kropli lakmusu. Alkaliczny odczyn mleka sprawia, że mieszanina barwi się na kolor niebieski. Do jednej z nich dodać 10 kropel uprzednio wymieszanego soku trzustkowego. Obie probówki wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 30 minut. Porównać zabarwienia.

c. wykazanie obecności amylazy

Do dwóch probówek dodać po 2 ml kleiku skrobiowego. Do jednej z nich dodać 10 kropel uprzednio wymieszanego soku trzustkowego. Obie probówki wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 30 minut. Po inkubacji zawartość każdej z probówek rozdzielić na dwie części. Jedną z nich poddać próbie redukcyjnej (Benedicta), a z drugą wykonać próbę z płynem Lugola (próby opisane w ćwiczeniu **Węglowodany**). Zinterpretować wyniki doświadczenia.

Z a d a n i e

1. Zbadać, czy badany płyn zawiera *pepsynę, amylazę, lipazę, proteazy trzustkowe*.
2. Zmierzyć kwasowość soku żołądkowego.

Prędkość maksymalna reakcji enzymatycznej i stała Michaelisa

Cel ćwiczenia: *pomiar prędkości maksymalnej i wyznaczenie stałej Michaelisa reakcji katalizowanej przez sacharazę*

Prędkość reakcji enzymatycznej mierzymy ilością substratu przekształcanego przez enzym w jednostce czasu. Katalityczne działanie enzymu polega na uaktywnieniu substratu przez wytworzenie z nim przejściowego kompleksu, który następnie rozpada się na produkt(y) reakcji i wolny enzym:

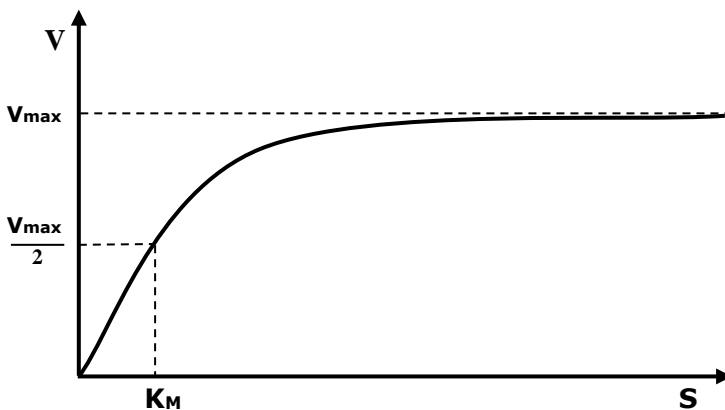


E - enzym, **S** - substrat, **ES** - kompleks:enzym-substrat, **P** - produkt.

Kompleks Enzym-Substrat powstaje w wyniku „skutecznego zderzenia” cząsteczki enzymu z cząsteczką substratu, to znaczy takiego zderzenia, po którym obie cząsteczki uzyskują dostateczną energię do wejścia w reakcję chemiczną. Przy stałym stężeniu enzymu liczba takich zderzeń wzrasta wraz ze wzrostem stężenia substratu. Przy niedoborze substratu w układzie reagującym nie wszystkie cząsteczki enzymu biorą udział w reakcji. Zwiększenie stężenia substratu powoduje, iż więcej cząsteczek enzymu wejdzie w kontakt z substratem. Z tego powodu prędkość reakcji enzymatycznej rośnie wraz ze wzrostem stężenia substratu. Po osiągnięciu pewnej wartości stężenia wszystkie cząsteczki enzymu wchodzi w kontakt z substratem. Dalszy wzrost stężenia substratu nie zwiększa prędkości reakcji enzymatycznej. Reakcja osiągnęła prędkość maksymalną (V_{\max}). Niektóre reakcje enzymatyczne osiągają prędkość maksymalną już przy małym stężeniu substratu. Świadczy to o dużym powinowactwie enzymu do substratu. W niektórych przypadkach prędkość maksymalna jest osiągalna przy dużych stężeniach substratu. Świadczy to o małym powinowactwie enzymu do substratu.

Miarą powinowactwa enzymu do substratu jest **stała Michaelisa**. Jest to takie stężenie substratu (wyrażone w molach na liter), przy którym prędkość reakcji enzymatycznej jest równa połowie prędkości maksymalnej.

W celu oznaczenia prędkości maksymalnej i stałej Michaelisa inkubujemy enzym o stałym stężeniu z substratem o zmiennym (rosnącym) stężeniu, przez jednakowy czas. Po przerwaniu inkubacji, we wszystkich probówkach oznaczamy produkt reakcji (będący miarą ilości zużytego substratu) i wykreślamy zależność prędkości reakcji (na osi rzędnych) od stężenia substratu (na osi odciętych). Zaobserwujemy zależność przedstawioną na Rycinie. Nosi ona nazwę wykresu Michaelisa-Menten. Z wykresu tego można odczytać wartość prędkości maksymalnej (V_{\max}) i stałej Michaelisa (K_M).



Sacharaza jest enzymem rozkładającym sacharozę na glukozę i fruktozę. W trakcie reakcji jedna cząsteczka nieredukującego substratu (sacharozę) rozpada się na dwie cząsteczki redukujących produktów (glukozy i fruktozy). Postęp reakcji można ocenić przez pomiar przyrostu ilości cukrów redukujących w płynie inkubacyjnym.

Produkty reakcji, tj. glukozę i fruktozę oznaczamy metodą Folina-Wu. W metodzie tej wykorzystuje się właściwości redukcyjne powstałych cukrów. Podczas ogrzewania, heksozy redukują jony miedzi (II) zawarte w alkalicznym roztworze CuSO_4 do jonów miedzi (I). W następnym etapie jony miedzi (I) przekazują elektrony na anion fosfomolibdenianowy z wytworzeniem barwnego kompleksu zwanego błękitem molibdenowym. Intensywność barwy jest proporcjonalna do zawartości cukrów redukujących, które można oznaczyć kolorymetrycznie wobec próby kontrolnej, która eliminuje m.in. wpływ jonów miedzi (II) na barwę roztworu.

Dwa mole powstałych produktów odpowiadają jednemu molowi rozłożonego substratu.

Wykonanie

1. Przebieg reakcji

Przygotować roztwory substratu o różnych stężeniach. W tym celu do czterech probówek kalibrowanych dodawać kolejno 1,5, 2,5, 3,5 i 5,0 ml 0,4M roztworu sacharozy. Zawartość probówek uzupełnić wodą destylowaną do 10 ml, zamknąć korkiem i dokładnie wymieszać. Stężenia sacharozy w poszczególnych probówkach wynoszą odpowiednio: 0,06M, 0,10M, 0,14M, 0,20M.

Przygotować następne 6 zwykłych probówek ponumerowanych od **1** do **6**. Do probówek od **1** do **4** odmierzyć po 1 ml uprzednio sporządzonych roztworów sacharozy, o następujących stężeniach:

probówka nr 1 - 0,06M

probówka nr 2 - 0,10M

probówka nr 3 - 0,14M

probówka nr 4 - 0,20M

Do probówki nr **5** odmierzyć 1 ml 0,40M roztworu sacharozy.

Probówki te wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 30°C, na około 5 minut, w celu doprowadzenia próbek do temperatury reakcji.

Do probówki **6** (próba kontrolna) dodać 1 ml wyciągu drożdżowego i ogrzewać przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej w celu inaktywacji enzymu, a następnie ochłodzić i dodać 1 ml 0,40M roztworu sacharozy.

Do probówek od **1** do **5** odmierzyć po 1 ml wyciągu drożdżowego i inkubować dalej w temperaturze 30°C, dokładnie przez 10 minut. Po upływie tego czasu natychmiast wstawić probówki do wrzącej łaźni wodnej na 5 minut w celu przerwania reakcji poprzez termiczną inaktywację enzymu. Zawartość każdej probówki (od **1** do **6**) przenieść ilościowo do kolbek miarowych (z korkiem) o pojemności 100 ml (3-krotnie splukując wodą destylowaną każdą probówkę). Następnie zawartość kolbek uzupełnić wodą destylowaną do 100 ml i dokładnie wymieszać.

2. Oznaczanie cukrów redukujących w płynie poinkubacyjnym

Wszystkie oznaczenia wykonać podwójnie. Do ponumerowanych probówek odpowiednio dodać:

- 1-2 po 0,5 ml płynu z kolbki miarowej nr **1**
- 3-4 po 0,5 ml płynu z kolbki miarowej nr **2**
- 5-6 po 0,5 ml płynu z kolbki miarowej nr **3**
- 7-8 po 0,5 ml płynu z kolbki miarowej nr **4**
- 9-10 po 0,5 ml płynu z kolbki miarowej nr **5**
- 11-12 po 0,5 ml płynu z kolbki miarowej nr **6**

Następnie do każdej probówki dodać po 1 ml alkalicznego roztworu siarczanu miedzi (II). Wszystkie probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej, dokładnie na 8 minut, po czym natychmiast zanurzyć je w zimnej wodzie. Po oziębieniu do każdej probówki dodać po 1 ml roztworu kwasu fosfomolibdenowego, intensywnie wymieszać. Następnie dopełnić wodą destylowaną do 5 ml i ponownie wymieszać. Oznaczyć absorbancję światła o długości fali 650 nm (w probówkach **1-10**) w stosunku do próby kontrolnej (probówki **11-12**). Odczytać ilość cukrów redukujących z krzywej kalibracyjnej.

3. Sporządzanie krzywej kalibracyjnej

Przygotować 5 ponumerowanych probówek (**1-5**). Do probówki nr **1** wlać 1 ml wody (próba kontrolna). Do pozostałych (**2-5**) dodawać kolejno: 0,1, 0,2, 0,5 i 1,0 ml 0,0005M roztworu glukozy. Zawartość probówek **2-4** uzupełnić do 1 ml wodą destylowaną. Do każdej probówki dodać po 2 ml alkalicznego roztworu CuSO_4 , ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej dokładnie przez 8 minut i ochłodzić w zimnej wodzie. Następnie dodać po 2 ml roztworu kwasu fosfomolibdenowego, dopełnić do 10 ml wodą destylowaną i dokładnie wymieszać. Oznaczyć absorbancję prób badanych (**2-5**) przy 650 nm w stosunku do próby kontrolnej (probówka nr **1**). Obliczyć zawartość glukozy w mikromolach. Wykreślić zależność pomiędzy absorbancją a ilością glukozy. Na osi rzędnych oznaczyć absorbancję, na osi odciętych ilość glukozy w mikromolach.

4. Przedstawienie wyników

Oznaczona ilość cukrów redukujących w mikromolach, pomnożona przez współczynnik 5 daje prędkość reakcji w poszczególnych próbach, wyrażoną w mikromolach sacharozy rozłożonej w ciągu 1 minuty. Współczynnik obliczono na podstawie następujących danych: objętość wyjściowa substratu (1 ml) została rozcieńczona do 100 ml. Z jednego mikromola sacharozy powstają 2 mikromole heksoz. Czas działania enzymu wynosi 10 minut. Wobec tego należy wynik pomiaru pomnożyć przez 100, podzielić przez 2 i przez 10.

Wyliczyć stężenie sacharozy (substratu) w reagującym układzie pamiętając, że roztwory sacharozy zostały dwukrotnie rozcieńczone wyciągiem z drożdży. Wyniki przedstawić w Tabeli.

Nr próby	Stężenie sacharozy [mmol/l]	A_{650}	Ilość μ moli cukrów redukujących	Prędkość reakcji [w μ molach sacharozy rozłożonej w czasie 1 minuty]
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Na podstawie danych zawartych w Tabeli wykreślić zależność prędkości reakcji [V] od stężenia substratu [S]. Na osi rzędnych oznaczyć prędkość reakcji, a na osi odciętych stężenie substratu. Z wykresu odczytać wartości: prędkości maksymalnej [V_{max}] oraz stałej Michaelisa [K_M].

Aktywność enzymatyczna

Cel ćwiczenia: wyznaczenie aktywności enzymu na przykładzie sacharazy z drożdży

Aktywność enzymu jest prędkością reakcji enzymatycznej mierzoną w ściśle określonych warunkach. Podstawową jednostką aktywności enzymatycznej jest **katal** (kat). Jest to taka aktywność enzymu, który przekształca 1 mol substratu w produkt(y) w czasie 1 sekundy, w temperaturze 30°C, w optymalnym pH, w warunkach reakcji rzędu zerowego (przy pełnym wysyceniu enzymu substratem). Jednostkami pochodnymi są milikatale (mkat = 1×10^{-3} kat), mikrokatale (μ kat = 1×10^{-6} kat), nanokatale (nkat = 1×10^{-9} kat) i pikokatale (pkat = 1×10^{-12} kat).

Aktywność enzymu można też wyrażać przy pomocy **międzynarodowej jednostki enzymatycznej (u)**. Jest to aktywność enzymu przekształcającego 1 mikromol substratu w czasie 1 minuty, w temperaturze 30 °C, w optymalnym pH, w warunkach reakcji rzędu zerowego. Jednostka międzynarodowa odpowiada 16,67 nkat.

Sacharaza jest jedną z *disacharydaz* związanych z powierzchnią rąbka szczoteczki błony śluzowej jelita cienkiego, która rozkłada sacharozę zawartą w pokarmach do glukozy i fruktozy. Enzym ten jest szeroko rozpowszechniony w komórkach roślinnych. Źródłem *sacharazy* stosowanej na ćwiczeniach jest wyciąg z drożdży piekarskich. Jego preparatyka polega na mechanicznej homogenizacji komórek drożdży, ekstrakcji lipidów eterem, ekstrakcji sacharazy wodą destylowaną i oddzieleniu nierozpuszczalnych składników homogenatu poprzez filtrację na lejku *Büchnera*.

Aby oznaczyć **aktywność** tego enzymu należy ściśle określoną ilość wyciągu z drożdży inkubować z jednakową ilością substratu (sacharozę), w temperaturze 30°C, przez różny okres czasu - od 10 do 40 minut. Po zakończeniu inkubacji należy oznaczyć ilość powstałych produktów (cukrów redukujących) i wyliczyć, ile moli sacharozę uległo rozkładowi w ciągu 1 sekundy (aktywność w katalach).

Produkty reakcji, tj. **glukozę** i **fruktozę** oznaczamy metodą Folina-Wu. W metodzie tej wykorzystuje się własności redukcyjne powstałych cukrów. Podczas ogrzewania, heksozy redukują jony miedzi (II) zawarte w alkalicznym roztworze CuSO_4 do jonów miedzi (I). W następnym etapie jony miedzi (I) przekazują elektrony na anion fosfomolibdenianowy z wytworzeniem barwnego kompleksu zwanego błękitem molibdenowym. Intensywność barwy jest proporcjonalna do zawartości cukrów redukujących, które można oznaczyć kolorymetrycznie wobec próby kontrolnej, która eliminuje m.in. wpływ jonów miedzi (II) na barwę roztworu.

Z ilości powstałych produktów (heksoz) obliczamy ilość rozłożonego substratu (sacharozy) pamiętając, że z 1 mola sacharozy powstają 2 mole heksoz (cukrów redukujących). W tym celu należy sporządzić na papierze milimetrowym wykres przedstawiający zależność ilości rozłożonej sacharozy od czasu reakcji. Na osi rzędnych oznaczamy ilość rozłożonego substratu w mikromolach, a na osi odciętych czas reakcji w minutach. Aktywność enzymu oblicza się z liniowego odcinka tej krzywej. Przedstawia on wprost proporcjonalną zależność pomiędzy ilością rozłożonego substratu a czasem reakcji.

Obliczanie aktywności enzymu polega na wyliczeniu liczby moli substratu, który uległ rozkładowi w ciągu jednej sekundy, przez *sacharazę*, zawartą w 1 ml nierozcieńczonego wyciągu z drożdży. Jest to równoznaczne z wyliczeniem aktywności enzymu w katalach lub jego pochodnych.

W y k o n a n i e

1. Preparatyka sacharazy

Studenci otrzymują gotowy wyciąg z drożdży zawierający *sacharazę*, który należy rozcieńczyć.

2. Rozcieńczanie wyciągu

Przenieść 1 ml wyciągu z drożdży do kolby miarowej o pojemności 50 ml, dopełnić wodą destylowaną do kreski i starannie wymieszać. Następnie przenieść 2,5 ml tego roztworu do kolejnej kolby o pojemności 50 ml, dodać

10 ml 0,1M buforu octanowego o pH 5, dopełnić wodą destylowaną do kreski i starannie wymieszać. Obliczyć rozcieńczenie.

3. Pomiar aktywności enzymu

Przygotować 10 probówek i oznakować je kolejnymi numerami od **1** do **10**. Do probówek **1** i **2** (próby kontrolne) dodać po 0,5 ml rozcieńzonego wyciągu enzymatycznego, ogrzewać przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej, a następnie dodać po 1 ml alkalicznego roztworu CuSO_4 .

Do wszystkich probówek (**1-10**) dodać po 0,5 ml 0,1M roztworu sacharozy. Probówki (**3-10**) oraz przygotowany wyciąg z drożdży wstawić na 5 minut do łaźni wodnej o temperaturze 30°C. Następnie do każdej z nich dodać po 0,5 ml rozcieńzonego wyciągu z drożdży (możliwie jak najszybciej). Od tej chwili w probówkach **3-10** rozpoczyna się reakcja. W probówkach **1-2** reakcja nie zachodzi z powodu inaktywacji termicznej enzymu. Inkubować poszczególne probówki przez okres czasu wskazany w Tabeli. Po upływie czasu inkubacji (różnego dla poszczególnych probówek) natychmiast przerwać reakcję, inaktywując enzym przez dodanie 1 ml alkalicznego roztworu CuSO_4 i umieścić je we wrzącej łaźni wodnej dokładnie na 8 minut. Po tym czasie zanurzyć probówki w zimnej wodzie. Po oziębieniu, do każdej probówki dodać po 1 ml roztworu kwasu fosfomolibdenowego, intensywnie wymieszać i dopełnić do 5 ml wodą destylowaną. Zmierzyć absorbancję prób **3-10** przy 650 nm w stosunku do prób kontrolnych (probówka **1** i **2**). Odczytać ilość cukrów redukujących z krzywej kalibracyjnej.

4. Sporządzanie krzywej kalibracyjnej

Krzywą kalibracyjną sporządzić tak, jak to opisano w ćwiczeniu **Prędkość maksymalna reakcji enzymatycznej i stała Michaelisa**.

5. Przedstawienie wyników

Z ilości mikromoli cukrów redukujących w poszczególnych próbach obliczyć ilość mikromoli sacharozy rozłożonej przez 1 ml nierozcieńzonego wyciągu z drożdży. Należy uwzględnić fakt, że z jednego mola sacharozy powstają dwa mole cukrów redukujących. Wyniki zestawić w Tabeli.

Na podstawie wyników zawartych w Tabeli wykreślić zależność pomiędzy ilością rozłożonej sacharozy (oś rzędnych) a czasem inkubacji (oś odciętych). Obliczyć aktywność enzymu w międzynarodowych jednostkach enzymatycznych i mikrokatalach na ml nierozcieńzonego wyciągu.

Nr próby	Zawartość	Czas inkubacji [min.]	A ₆₅₀	Liczba mikromoli cukrów redukujących	Liczba mikromoli rozłożonej sacharozy	
					Enzym rozcieńczony	Enzym nierozcieńczony
1 2	Enzym zdenaturowany + sacharoza	0				
3 4	Enzym aktywny + sacharoza	10				
5 6	"	20				
7 8	"	30				
9 10	"	40				

Inhibicja kompetycyjna i niekompetycyjna

Cel ćwiczenia: *poznanie różnic pomiędzy inhibicją kompetycyjną i niekompetycyjną na przykładzie inhibitorów dehydrogenazy bursztynianowej*

Inhibicja jest to zjawisko hamowania aktywności enzymów. Substancje hamujące aktywność enzymu to inhibitory. Dzielią się one na dwie podstawowe grupy: inhibitory kompetycyjne i niekompetycyjne.

Inhibicja kompetycyjna

Inhibitor kompetycyjny wykazuje podobieństwo strukturalne do substratu i konkuruje z nim o miejsce aktywne enzymu. Enzym „nie potrafi” odróżnić substratu od inhibitora i „omyłkowo” (zamiast substratu) wiąże inhibitor kompetycyjny w swoim miejscu aktywnym. Powstały kompleks **enzym-inhibitor** nie może ulec dalszej przemianie. W obecności enzymu, substratu i inhibitora istnieje możliwość zajścia dwóch reakcji:

- A. Enzym + Substrat → Enzym-Substrat → Enzym + Produkt
- B. Enzym + Inhibitor → Enzym-Inhibitor

Liczba cząsteczek enzymu (przy jego stałym stężeniu) zaangażowanych w reakcji zależy od stosunku stężeń substratu i inhibitora. Im wyższe będzie stężenie substratu w stosunku do inhibitora, tym mniej cząsteczek enzymu będzie wiązać się z inhibitorem. Przy stałym stężeniu enzymu i inhibitora i wzrastającym stężeniu substratu następuje odłączenie coraz większej liczby cząsteczek inhibitora od enzymu i zastępowanie go przez substrat. Kompleks Enzym-Inhibitor przekształca się w kompleks Enzym-Substrat, a inhibitor zostaje wyparty z miejsca aktywnego enzymu. Hamowanie reakcji wywołane inhibitorem kompetycyjnym może być zatem odwrócone poprzez zwiększenie stężenia substratu.

Przy odpowiednio dużym stężeniu substratu prędkość maksymalna reakcji (V_{\max}), pomimo obecności inhibitora, osiąga wartość obserwowaną w układzie niezawierającym inhibitora. Mówiąc inaczej, do osiągnięcia V_{\max} w obecności inhibitora kompetycyjnego potrzeba większego stężenia

substratu, niż w układzie wolnym od tego inhibitora. Oczywiście większe stężenie substratu będzie potrzebne również do osiągnięcia $V_{\max}/2$, co oznacza, że stała Michaelisa (K_M) w obecności inhibitora kompetycyjnego osiąga większą wartość.

Inhibicja niekompetycyjna

Inhibitor niekompetycyjny nie wykazuje podobieństwa do substratu. Wiąże się on z enzymem poza miejscem aktywnym (w innym miejscu niż substrat). Miejsce aktywne enzymu wiąże substrat, lecz "nie potrafi" go przekształcić w produkt. Nawet znaczne zwiększenie stężenia substratu nie jest wówczas w stanie odwrócić inhibicji. Inhibitor niekompetycyjny może wiązać się z wolnym enzymem lub z kompleksem Enzym-Substrat. Reakcje mogą przebiegać według poniższych schematów:

- A. Enzym + Inhibitor \rightarrow Enzym-Inhibitor
- B. Enzym-Inhibitor + Substrat \rightarrow Enzym-Substrat-Inhibitor
- C. Enzym-Substrat + Inhibitor \rightarrow Enzym-Substrat-Inhibitor

Zarówno kompleks: **Enzym-Inhibitor**, jak i **Enzym-Substrat-Inhibitor** są nieaktywne i „nie potrafią” przekształcić substratu w produkt. W obecności inhibitora niekompetycyjnego V_{\max} ma mniejszą wartość, niezależnie od stężenia substratu, natomiast wartość K_M nie ulega zmianie.

Główne różnice między inhibitorem kompetycyjnym i niekompetycyjnym przedstawia poniższa Tabela.

	Inhibitor kompetycyjny	Inhibitor niekompetycyjny
Budowa	podobny do substratu	niepodobny do substratu
Miejsce wiązania	miejsce aktywne	poza miejscem aktywnym
Odwracalność inhibicji przez wzrost stężenia substratu	odwracalna	nieodwracalna
V_{\max}	nie zmienia się, lecz jest osiągana przy wyższym stężeniu substratu	maleje
K_M	wzrasta	nie zmienia się

Dehydrogenaza bursztynianowa utlenia bursztynian do fumaranu, poprzez odłączenie 2 atomów wodoru. Ich bezpośrednim akceptorem jest **dinukleotyd flawinoadeninowy** (FAD), a następnie **koenzym Q**, który przechodzi w formę zredukowaną (QH₂). Począwszy od tego ostatniego dalszy transport elektronów zachodzi niezależnie od transportu protonów. Elektrony przechodzą poprzez **cytochrom b**, **cytochrom c₁**, **cytochrom c** oraz **cytochrom a+a₃** na tlen. Powstaje anion tlenkowy O²⁻, który wiąże się z dwoma protonami tworząc cząsteczkę wody.

W naszym doświadczeniu zostanie zastosowany sztuczny akceptor elektronów, żółto-zielony heksacyjanożelazian (III) potasu - K₃[Fe(CN)₆], który w wyniku redukcji przejdzie w bezbarwny heksacyjanożelazian (II) potasu - K₄[Fe(CN)₆]. Tak więc miarą aktywności *dehydrogenazy bursztynianowej* będzie stopień odbarwienia roztworu heksacyjanożelazianu potasu.

Inhibitorem **kompetycyjnym** *dehydrogenazy bursztynianowej* jest malonian, związek bardzo podobny do kwasu bursztynowego, od którego różni się brakiem jednej grupy -CH₂. Konkuruje z nim o miejsce aktywne enzymu. Malonian wiąże się z dehydrogenazą, a powstały kompleks Enzym-Inhibitor nie może ulec dalszej przemianie. W wyniku tego procesu dochodzi do zahamowania reakcji katalizowanej przez *dehydrogenazę bursztynianową*. Zwiększenie stężenia substratu (bursztynianu) jest w stanie odwrócić tą inhibicję.

Inhibitorami **niekompetycyjnymi** *dehydrogenazy bursztynianowej* są sole metali ciężkich. Wspomniany enzym do swej funkcji katalitycznej wymaga obecności wolnych grup -SH. Jony metali ciężkich (np. Hg²⁺) wiążą się z siarką grup -SH hamując aktywność tego enzymu. Zwiększenie stężenia substratu (bursztynianu) nie jest w stanie odwrócić tej inhibicji.

Doświadczenie polega na inkubacji homogenatu wątroby szczura, zawierającego *dehydrogenazę bursztynianową*, z bursztynianem o różnym stężeniu, w obecności lub nieobecności inhibitorów - malonianu i HgCl₂, w środowisku zawierającym sztuczny akceptor elektronów - K₃[Fe(CN)₆]. Po przerwaniu reakcji przy pomocy kwasu trichlorooctowego, w klarownym przesączu oceniamy zależność stopnia odbarwienia roztworu od obecności i relacji stężeń substratu i inhibitorów, przy stałym stężeniu enzymu.

Wykonanie

1. Przygotowanie probówek z płynami inkubacyjnymi

Do ponumerowanych probówek (**1-12**) odmierzyć, w dowolnej kolejności, odczynniki wg załączonej Tabeli, a do probówki **2** wlać dodatkowo 2 ml 10% kwasu trichlorooctowego. Sumaryczna objętość roztworu reagującego we wszystkich probówkach będzie jednakowa i wyniesie 4 ml (bez uwzględnienia kwasu trichlorooctowego).

Probówka nr **1** jest próbą kontrolną bez substratu (zawiera równoważną objętość wody). Probówka **2** jest próbą kontrolną, zawierającą **nieaktywny enzym** (zdenaturowany przez kwas trichlorooctowy) Następnie wszystkie probówki (**1-12**) wstawić do łaźni wodnej o temp 37°C na 5 min w celu doprowadzenia reagujących płynów do tej temperatury.

Nr próby	0,1M bufor fosforanowy [ml]	0,1M bursztynian sodu [ml]	0,05M malonian sodu [ml]	0,01M HgCl ₂ [ml]	0,5% K ₃ [Fe(CN) ₆] [ml]	H ₂ O [ml]
1	1	0	0	0	0,5	2,5
2	1	0,1	0	0	0,5	2,4
3	1	0,1	0	0	0,5	2,4
4	1	0,1	0	0	0,5	2,4
5	1	0,1	0,1	0	0,5	2,3
6	1	0,1	0,1	0	0,5	2,3
7	1	0,1	0	0,1	0,5	2,3
8	1	0,1	0	0,1	0,5	2,3
9	1	2,0	0,1	0	0,5	0,4
10	1	2,0	0,1	0	0,5	0,4
11	1	2,0	0	0,1	0,5	0,4
12	1	2,0	0	0,1	0,5	0,4

2. Inkubacja układów reagujących

Po wstępnej inkubacji do każdej probówki dodać po 1 ml homogenatu wątroby szczura. Wymieszać i inkubować przez 30 minut, a następnie do każdej probówki (z wyjątkiem probówki nr **2**) dodać 2 ml 10% kwasu trichlorooctowego. Próby przesączyć przez małe sączki do innych probówek oznaczonych tymi samymi numerami.

3. Interpretacja wyników

Podczas 30 minutowej inkubacji przygotować Tabelę wg załączonego schematu. Wyliczyć stężenia substratu oraz inhibitorów w poszczególnych probówkach.

Stwierdzić, w których probówkach nastąpiło odbarwienie heksacyjanożelazianu (III) potasu (zaznaczyć w Tabeli).

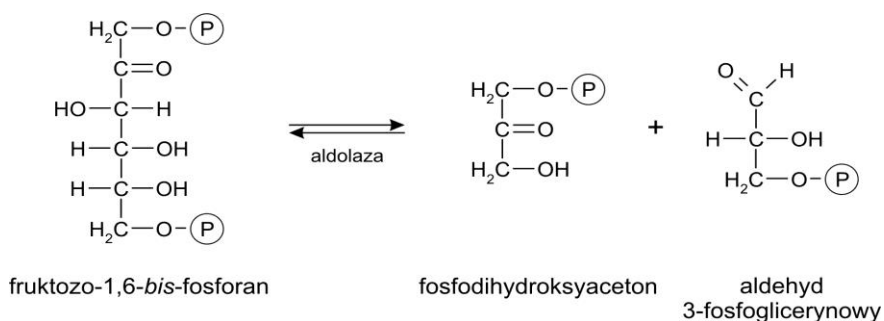
Nr próby	Stężenie bursztynianu [mM]	Stężenie malonianu [mM]	Stężenie HgCl ₂ [mM]	Odbarwienie heksacyjanożelazianu (+ lub -)

Na podstawie wyników zestawionych w Tabeli określić, w których probówkach zaszła inhibicja. Przeanalizować stosunki stężeń użytego substratu i inhibitora. Na tej podstawie wskazać, w których probówkach doszło do odwrócenia inhibicji. Przeanalizować, w którym przypadku nastąpiła zmiana stałej Michaelisa.

Aktywność aldolazy fruktozo-1,6-bis-fosforanowej

Cel ćwiczenia: prześledzenie przebiegu reakcji aldolazowej

Aldolaza fruktozo-1,6-bis-fosforanowa jest enzymem należącym do klasy *liaz*, katalizującym odwracalną reakcję rozpadu i syntezy fruktozo-1,6-bis-fosforanu. Pod działaniem tego enzymu powstają lub zużywają się dwie fosfotriozy: fosfodihydroksyaceton i aldehyd 3-fosfoglicerynowy. W stanie równowagi relacje ilościowe pomiędzy fruktozo-1,6-bis-fosforanem i fosfotriozy ustalają się na poziomie 89% do 11%. Reakcja aldolazowa dostarcza fosfotriozy w procesie glikolizy i odwrotnie zużywa fosfotriozy w procesie glukoneogenezy. Reakcja zachodząca przy udziale tego enzymu jest biochemiczną odmianą reakcji znanej w chemii organicznej jako kondensacja aldolowa. Stąd pochodzi nazwa enzymu - **aldolaza**.



Powyższa rycina przedstawia reakcję katalizowaną przez *aldolazę*.

Aldolaza jest enzymem cytosolowym, występującym w każdej komórce. Opisano kilka izoform tego enzymu. W dużych ilościach występuje w mięśniach szkieletowych, w narządach mięszzowych (wątroba, nerka) oraz w erytrocytach.

Wszystkie izoenzymy zbudowane są z czterech identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej około 40 kDa każda. Tetrameryczna budowa warunkuje aktywność *aldolazy*. Zakwaszenie powoduje dysocjację enzymu na nieaktywne podjednostki. Po zobojętnieniu podjednostki łączą się spontanicznie tworząc aktywną formę enzymu.

Ćwiczenie polega na wykazaniu powstawania fosfotrioz z fruktozo-1,6-*bis*-fosforanu pod działaniem *aldolazy* zawartej w wyciągu z homogenatu mięśni królika i *aldolazy* zawartej w surowicy krwi. Aktywność aldolazowa w surowicy jest niewielka, a może narastać w stanach patologicznych na skutek przenikania tego enzymu z uszkodzonych tkanek do krwi.

Do oznaczania produktów reakcji aldolazowej wykorzystuje się barwną reakcję trioz (aldehydu i ketonu) z 2,4-dinitrofenylohydrazyną. Wolne triozy łatwiej wchodzi w reakcję kondensacji niż ich estry fosforanowe, dlatego powstałe fosfotriozy poddaje się najpierw hydrolizie zasadowej w celu odłączenia fosforanu. W wyniku reakcji kondensacji trioz z 2,4-dinitrofenylohydrazyną tworzą się odpowiednie 2,4-dinitrofenylohydrazony.

W celu zahamowania obecnej w tkankach *dehydrogenazy 3-fosfogliceroaldehydowej*, mogącej utlenić powstały aldehyd 3-fosfoglicerynowy do 1,3-bis-fosfoglicerynianu, stosuje się kwas monojodooctowy. Jest to szczególnie ważne przy badaniu reakcji aldolazowej w homogenatach tkankowych, gdzie (w odróżnieniu od surowicy) oba te enzymy (*aldolaza* i *dehydrogenaza 3-fosfogliceroaldehydowa*) występują obok siebie. Obecność hydrazyny w czasie inkubacji substratu z aldolazą powoduje przesunięcie równowagi odwracalnej reakcji enzymatycznej, w kierunku tworzenia fosfotrioz.

Wykonanie

Przygotować **6** probówek: **3** probówki do badania przebiegu reakcji katalizowanej przez aldolazę mięśni i **3** probówki do badania reakcji katalizowanej przez aldolazę surowicy krwi (patrz Tabela). Do wszystkich probówek odmierzyć po 0,5 ml roztworu fruktozo-1,6-*bis*-fosforanu w buforze hydrazynowym (pH 8,2) zawierającym kwas monojodooctowy. Do probówki **drugiej** i **trzeciej** dodać po 0,1 ml ekstraktu z mięśni królika, a do **piątej** i **szóstej** po 0,1 ml surowicy krwi.

Probówki (**1-6**) wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 30 minut. Po zakończeniu inkubacji do wszystkich probówek dodać po 0,1 ml 2M HCl celem inaktywacji enzymu, a następnie do probówki pierwszej dodać 0,1 ml ekstraktu z mięśni, a do czwartej 0,1 ml surowicy krwi (próby **1** i **4** - kontrolne).

Dalsze postępowanie jest jednakowe dla wszystkich prób. Do probówek dodać po 0,5 ml 0,6M NaOH i pozostawić w temperaturze pokojowej na 30 minut. Następnie dodać po 0,5 ml roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny i wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 30 minut. Po upływie tego czasu dodać po 4,5 ml 0,6M NaOH i odstawić w zaciemnione miejsce na około 10 minut.

<i>Wyciąg z mięśni</i>		<i>Surowica krwi</i>	
Próba kontrolna (probówka 1)	Próby właściwe (probówki 2 i 3)	Próba kontrolna (probówka 4)	Próby właściwe (probówki 5 i 6)
0,5 ml substratu	0,5 ml substratu 0,1 ml wyciągu z mięśni	0,5 ml substratu	0,5 ml substratu 0,1 ml surowicy
Inkubacja 30 minut w temperaturze 37°C			
0,1 ml 2M HCl 0,1 ml wyciągu z mięśni	0,1 ml 2M HCl	0,1 ml 2M HCl 0,1 ml surowicy	0,1 ml 2M HCl
0,5 ml 0,6M NaOH - 30 minut w temperaturze pokojowej			
0,5 ml 2,4-dinitrofenylohydrazyny - 30 minut w temperaturze 37°C			
4,5 ml 0,6M NaOH - 10 minut w zaciemnionym miejscu			

Porównać intensywność barwy w próbach właściwych z odpowiednimi próbami kontrolnymi. Wyniki przedstawić w Tabeli, oceniając intensywność zabarwienia trzema, dwoma lub jednym plusem.

W y n i k i			
N u m e r p r o b ó w k i			
1	2 - 3	4	5 - 6

Można też oznaczyć ilościowo powstałe triozy metodą kolorymetryczną, przez pomiar absorbancji światła o długości fali 570 nm, wobec próby kontrolnej. Jako standardu można użyć roztworu dihydroksyacetonu.

Oksydacyjna dekarboksylacja pirogronianu

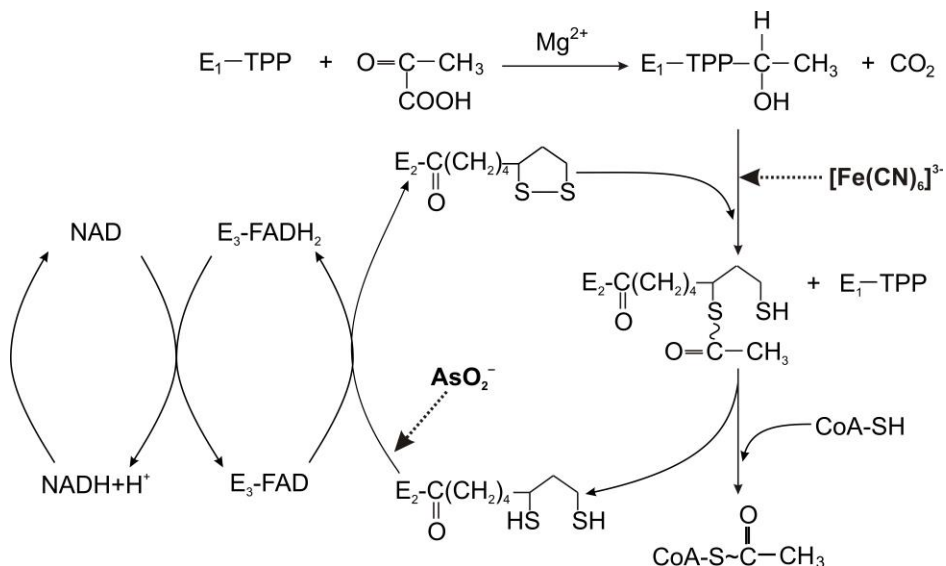
Cel ćwiczenia: obserwacja przebiegu reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu

Kwas pirogronowy jest produktem głównie glikolizy i deaminacji alaniny. W fizjologicznym pH występuje w postaci zdysocjowanej, jako anion zwany **pirogronianem** i ulega wielokierunkowym przemianom.

Większość pirogronianu jest przekształcana w macierzy mitochondrialnej do acetylo~S-CoA, w procesie **oksydacyjnej dekarboksylacji**, katalizowanej przez wieloenzymatyczny kompleks, określany mianem **dehydrogenazy pirogronianowej**. W skład tego kompleksu wchodzi *dekarboksylaza pirogronianowa* (E_1), *transacetylaza dihydrolipoilowa* (E_2) oraz *dehydrogenaza dihydrolipoilowa* (E_3). Koenzymem *dekarboksylazy pirogronianowej* jest pirofosforan tiaminy (TPP), koenzymem *transacetylazy dihydrolipoilowej* jest liponian, a koenzymem *dehydrogenazy dihydrolipoilowej* - dinukleotyd flawinoadeninowy w formie utlenionej (FAD), który przekazuje wodory pobrane z liponianu na utleniony dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NAD^+).

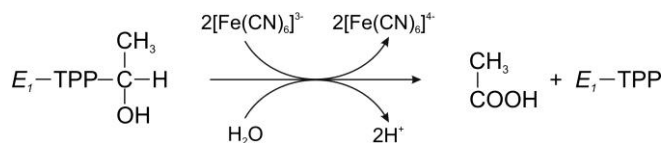
W pierwszym etapie pirogronian przyłącza się do pirofosforanu tiaminy z równoczesną dekarboksylacją (odłączeniem CO_2). Powstały aldehyd octowy, połączony z pierścieniem tiazolowym pirofosforanu tiaminy, ulega w drugim etapie oderwaniu z równoczesnym utlenieniem (odłączeniem pary wodorów). Reszta kwasu octowego przyłącza się poprzez wiązanie wysokoenergetyczne (tioestrowe) do atomu siarki liponianu. Atomy wodoru z aldehydu przechodzą na tiaminę i na drugi atom siarki liponianu. W trzecim etapie reszta kwasu octowego ulega przeniesieniu na koenzym A. Powstaje acetylo~S-CoA i zredukowany liponian. Ten ostatni ulega utlenieniu przy udziale *dehydrogenazy dihydrolipoilowej*, która przekazuje atomy wodoru pobrane z liponianu na FAD. Zredukowany FAD ($FADH_2$) przekazuje atom wodoru i elektron na NAD^+ . Powstały $NADH+H^+$ utlenia się dalej w łańcuchu oddechowym.

Przebieg oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu przedstawia w sposób uproszczony poniższy schemat:



Acetylo~S-CoA utlenia się w cyklu kwasu cytrynowego (Krebsa) do CO₂ i H₂O.

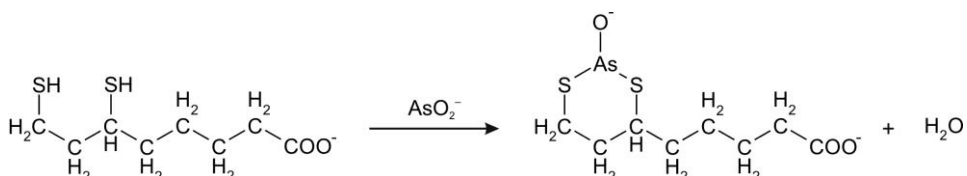
Ćwiczenie polega na wykazaniu zużycia pirogronianu dodanego do homogenatu wątroby szczura. Umożliwia prześledzenie zachodzących reakcji oksydoredukcyjnych oraz wskazuje na możliwość hamowania tego procesu przez arsenian (III). Akceptorem elektronów jest tlen bądź sztuczny akceptor - heksacyjanożelazian (III) potasu - K₃[Fe(CN)₆]. Związek ten bezpośrednio utlenia aldehyd octowy (połączony z pierścieniem tiazolowym pirofosforanu tiaminy) do kwasu octowego.



Reakcję przerywamy przez dodanie kwasu trichlorooctowego i oceniamy zużycie pirogronianu przy pomocy reakcji barwnej. W probówkach zawierających heksacyjanożelazian (III) potasu obserwujemy dodatkowo

zmianę zabarwienia roztworu w następstwie redukcji tego związku (o barwie żółtej) do bezbarwnego heksacyjanożelazianu (II) potasu $K_4[Fe(CN)_6]$. Arsenian (III) (AsO_2^-) jest typowym inhibitorem reakcji, w których biorą udział grupy $-SH$. W warunkach naszego doświadczenia hamuje przebieg reakcji katalizowanej przez *dehydrogenazę dihydrolipoilową*.

Mechanizm blokowania grup $-SH$ przez arsenian (III) przedstawia poniższe równanie:



Obecność heksacyjanożelazianu (III) potasu, jako sztucznego akceptora elektronów sprawia, że etap hamowany przez arsenian (III) zostaje ominięty. W tych warunkach arsenian nie hamuje zużycia pirogronianu.

Zawartość pirogronianu w układzie reagującym oceniamy przy pomocy reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną. Wszystkie α -ketokwasy, a więc i pirogronian, reagują z 2,4-dinitrofenylohydrazyną tworząc odpowiednie fenylhydrazony. Związki te rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych i można je wyekstrahować (np. octanem etylu). Po dodaniu octanu etylu i energicznym wytrząsaniu mieszanina rozwarstwia się. W fazie wodnej (dolna warstwa) pozostaje woda oraz sole znajdujące się w wyciągach tkankowych. W fazie organicznej (górną warstwą) gromadzą się fenylhydrazony i nadmiar wolnej fenylhydrazyny. Fenylhydrazony i fenylhydrazynę można łatwo rozdzielić. Różnią się one bowiem rozpuszczalnością w roztworze węgla sodu. Po usunięciu fazy wodnej, do fazy organicznej dodajemy roztwór Na_2CO_3 . Podczas wytrząsania fenylhydrazony przechodzą do fazy wodnej, zawierającej węglan sodu (dolna warstwa), a wolna fenylhydrazyna pozostaje w fazie organicznej octanu etylu (górną warstwą). 2,4-dinitrofenylhydrazon pirogronianu po alkalizacji roztworem $NaOH$ zmienia zabarwienie z żółtego na brunatno-czerwone (jak wszystkie aromatyczne związki nitrowe). Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia pirogronianu w układzie reagującym.

Wykonanie

1. Inkubacja

Do 6 ponumerowanych probówek (**1-6**) dodać odpowiednie ilości odczynników, według Tabeli I. Następnie do probówek kontrolnych (**1 i 4**) należy dodać po 4 ml 10% kwasu trichlorooctowego (TCA). Do wszystkich probówek dodać po 2 ml homogenatu wątroby szczura i inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 45 minut. Co 3-4 minuty zawartość probówek mieszać przez wstrząśnięcie.

Po zakończeniu inkubacji do probówek nr: **2, 3, 5 i 6** dodać po 4 ml TCA. Zawartość wszystkich probówek przesączyć przez małe sączki z bibuły filtracyjnej do kolejnego szeregu krótkich probówek.

Probówki z przesączami pozostawić do zakończenia ćwiczeń.

2. Wykazanie ubytku pirogronianu

Do **6** ponumerowanych probówek (jak w Tabeli II) odmierzyć po 0,5 ml odpowiednich przesączów i do każdego dodać po 0,5 ml roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny. Pozostawić w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie dodać po 4 ml octanu etylu i każdą z probówek wstrząsać energicznie przez 1 minutę lub przedmuchiwać przy pomocy odpowiedniej pipety. Odpipetować ostrożnie dolną warstwę wodną, przy użyciu odpowiedniej pipety, a do pozostałości odmierzyć po 3 ml 10% roztworu Na_2CO_3 i znów wstrząsać lub przedmuchiwać energicznie probówki przez jedną minutę. Z dolnej warstwy wodnej pobierać pipetą po 1,5 ml i przenieść do nowego szeregu identycznie ponumerowanych probówek. Do każdej z nich dodać po 1,5 ml 1,5M roztworu NaOH, wymieszać. Na podstawie różnic zabarwienia ocenić w których probówkach nastąpiło zużycie pirogronianu.

Porównać zużycie heksacyjanożelazianu (III) potasu w probówkach **4, 5 i 6**.

Tabela I

Próby bez heksacyjanożelazianu potasu

Próba		Zawartość				
		0,2M bufor fosf. pH 7,2	0,05M piro- gromian	0,1M heksa- cyjano- żelazian	0,02M arsenian	H₂O redest.
1	Kontrolna (enzymy zdenaturowane)	0,2 ml	0,1 ml	-	-	0,2 ml
2	Właściwa	0,2 ml	0,1 ml	-	-	0,2 ml
3	Właściwa z inhibitorem	0,2 ml	0,1 ml	-	0,1 ml	0,1 ml

Próby z heksacyjanożelazianem potasu

Próba		Zawartość				
		0,2M bufor fosf. pH 7,2	0,05M piro- gromian	0,1M heksa- cyjano- żelazian	0,02M arsenian	H₂O redest.
4	Kontrolna (enzymy zdenaturowane)	0,2 ml	0,1 ml	0,1ml	-	0,1 ml
5	Właściwa	0,2 ml	0,1 ml	0,1ml	-	0,1 ml
6	Właściwa z inhibitorem	0,2 ml	0,1 ml	0,1ml	0,1 ml	-

3. Przedstawienie wyników

Wyniki przedstawić w Tabeli II i przedyskutować. Formułując spostrzeżenia używać symboli: (+) - zużycie, (-) - brak zużycia.

Tabela II

				Próby z heksacyjanożelazianem potasu		
	Próba kontrolna	Próba właściwa	Próba właściwa z inhibi- torem	Próba kontrolna	Próba właściwa	Próba właściwa z inhibi- torem
Nr próby	1	2	3	4	5	6
pirogro- nian						
heksa- cyjano- żelazian						

Glutaminaza

Cel ćwiczenia: porównanie aktywności glutaminazy w nerce i mięśniu szkieletowym

Spośród ponad dwudziestu aminokwasów występujących w płynach ustrojowych i tkankach zwierzęcych **glutamina** odgrywa szczególną rolę w procesach metabolicznych. Pomimo dużej liczby reakcji enzymatycznych zużywających glutaminę, znajduje się ona w dużym stężeniu (0,5 do 0,9mM) w osoczu krwi i stanowi ponad 50% wewnątrzkomórkowej puli wolnych aminokwasów. **Glutamina** jest obojętnym, glukogennym aminokwasem, który może być syntetyzowany w organizmie przez szereg narządów zawierających *syntetazę glutaminy*. Glutamina odgrywa kluczową rolę w ogólnym metabolizmie azotowym. Jest dawcą grup aminowych do różnych biosyntez i jest przenośnikiem azotu pomiędzy różnymi narządami.

Głównymi producentami glutaminy są: mięsień szkieletowy i wątroba. Ponad połowa ogólnej ilości aminokwasów ustroju zwierzęcego znajduje się w mięśniach szkieletowych (głównie w białkach). Glutamina stanowi około 6% aminokwasów wchodzących w skład białek mięśniowych i niemal 25% aminokwasów uwalnianych przez mięśnie szkieletowe. Szkielet węglowodorowy glutaminy może pochodzić z dwóch źródeł. Pierwszym i prawdopodobnie najważniejszym jest glutaminian, pochodzący z rozpadu białek mięśniowych. Drugim jest α -ketoglutaran. Ten ostatni powstaje głównie jako metabolit cyklu kwasów trikarboksylowych (cyklu Krebsa) lub wytwarza się w trakcie przemian niektórych aminokwasów. Powstawanie glutaminy z α -ketoglutaranu zachodzi dwuetapowo. W pierwszym etapie, w wyniku transaminacji, powstaje glutaminian. Związanie amoniaku przez grupę γ -karboksylową glutaminianu prowadzi do powstania glutaminy.

Glutamina, uwolniona z mięśni szkieletowych, może być za pośrednictwem krwi transportowana i pobierana przez inne narządy, w których może ulegać wielokierunkowym przemianom. Ważną rolę w metabolizmie glutaminy w warunkach fizjologicznych odgrywa jelito cienkie i limfocyty, a w okresie laktacji także gruczoł mlekowy.

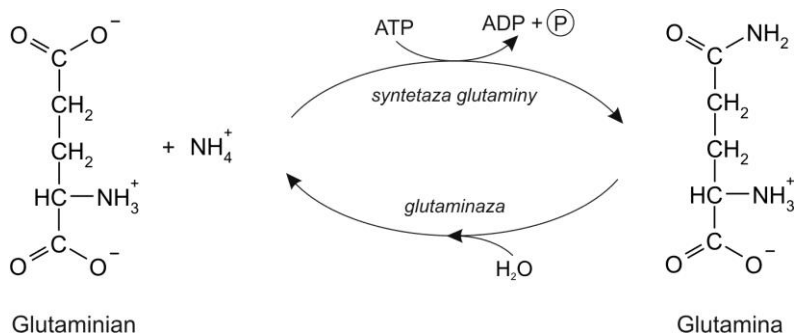
W szczególnych warunkach metabolicznych glutamina w dużych ilościach może być pobierana przez nerki. Zachodzi to głównie w przebiegu kwasicy. Zakwaszenie nerki aktywuje *glutaminazę*, która rozkłada glutaminę do amoniaku i glutaminianu. Uwolniony amoniak (NH_3) wiąże nadmiar jonów H^+ przechodząc w jon amonowy (NH_4^+), co zmniejsza objawy kwasicy.

W metabolizmie glutaminy podstawową rolę odgrywają dwa enzymy: *syntetaza glutaminy* i *glutaminaza*.

Syntetaza glutaminy jest szeroko rozpowszechniona w tkankach zwierzęcych. Występuje w cytosolu. Najwyższą aktywność tego enzymu (w przeliczeniu na gram tkanki) wykazuje wątroba, a w dalszej kolejności nerka, mózg i żołądek. Mięśnie szkieletowe wykazują niską aktywność syntetazy glutaminy, ale uwzględniając ich znaczną masę to mięśnie są głównym producentem glutaminy.

Glutaminaza występuje w mitochondriach wielu narządów zwierzęcych. Jest aktywowana przez fosforan nieorganiczny. W nieobecności fosforanu aktywność enzymu jest bardzo niska. Wyróżnia się dwie izoformy glutaminazy: wątrobową i nerkową. Pierwsza z nich występuje wyłącznie w wątrobie, a druga w nerce i w innych narządach.

Reakcje katalizowane przez *syntetazę glutaminy* i *glutaminazę* przedstawia poniższa rycina.



Porównamy zużycie glutaminy przez nerkę i mięsień szkieletowy. Wskaźnikiem zużycia glutaminy jest ilość amoniaku, uwolnionego w wyniku jej hydrolizy. Nerka jest narządem zużywającym glutaminę, zawiera *glutaminazę*, dlatego w czasie inkubacji skrawków nerki z glutaminą będzie uwalniany amoniak. Mięsień szkieletowy nie zawiera *glutaminazy*. W czasie inkubacji skrawków mięśnia szkieletowego z glutaminą nie uwalnia się amoniak.

Oznaczanie amoniaku polega na jego reakcji z fenolem w obecności chloranu (I). Powstaje barwny produkt reakcji, a intensywność barwy roztworu jest proporcjonalna do stężenia amoniaku.

W y k o n a n i e

1. Przygotowanie tkanek

Wypreparować mięśnie szkieletowe tylnych łap szczura oraz nerki i umieścić je w suchych naczyniach. Następnie odważyć po 0,5 g każdej tkanki. Nie wyjmując ze zlewek odważonych tkanek, pociąć je czystymi nożyczkami na drobne skrawki.

2. Przygotowanie roztworu glutaminy

Odmierzyć 70 ml 0,15M buforu fosforanowego o pH 8,2, w którym należy rozpuścić 200 mg glutaminy.

3. Inkubacja

Przygotować **16** plastikowych probówek wirowniczych, oznaczonych symbolami **I-5, I-10, I-15, I-20, II-5, II-10.....IV-15, IV-20**. Pierwsza cyfra oznacza numer układu reagującego (Tabela), druga – czas inkubacji w minutach. Do każdej z nich dodać po 0,25 ml 1M kwasu trichlorooctowego.

Do zlewek zawierających pocięte tkanki dodać po 10 ml odpowiedniego płynu inkubacyjnego, z glutaminą lub bez glutaminy (według Tabeli), a następnie zawartość przelać do odpowiednio ponumerowanych wysokich zlewek (I-IV) i inkubować w temperaturze 37°C przez 20 minut.

Układ reagujący	Narząd	0,15M bufor fosforanowy pH 8,2 [ml]	Roztwór glutaminy w 0,15M buforze fosforanowym [ml]
I	Mięsień szkieletowy	10	-
II	Mięsień szkieletowy	-	10
III	Nerka	10	-
IV	Nerka	-	10

Po 5, 10, 15 i 20 minutach inkubacji pobierać ze zlewek (I-IV) po 0,5 ml płynu inkubacyjnego (bez fragmentów tkanek) i przenieść do uprzednio przygotowanych i odpowiednio oznakowanych plastikowych probówek wirowniczych (I-5, I-10, I-15, I-20, II-5, II-10, II-15, II-20 itd.) zawierających kwas trichlorooctowy (przerwanie reakcji przez wytrącenie białka). Po 5-ciu minutach od zakończenia inkubacji dodać do każdej probówki po 0,25 ml 0,9M roztworu KOH w celu zubożenia kwasu trichlorooctowego. Zawartość wszystkich probówek wymieszać i wirować z prędkością 2.000 obrotów na minutę przez 10 minut. Oznaczyć stężenie amoniaku w supernatantach zebranych z nad osadu strąconego białka.

4. Kolorymetryczne oznaczanie amoniaku

Przygotować 18 probówek z korkami. Do dwóch (próby kontrolne) odmierzyć po 1 ml odczynnika fenolowego (fenol z pentacyjanonitrozylo-żelazianem (III) sodu) i po 0,1 ml wody wolnej od amoniaku.

Do odpowiednio oznakowanych (tak jak probówki wirownicze) pozostałych szesnastu probówek odmierzyć po 1,5 ml odczynnika fenolowego i przenieść do nich przy pomocy pipety automatycznej po 0,1 ml supernatantów. Następnie do każdej probówki oraz dwóch prób kontrolnych dodać po 1,5 ml odczynnika chloranowego (chloran (I) sodu w 0,5% NaOH), zamknąć je korkami, wymieszać i wstawić na 20 minut do łaźni wodnej o temperaturze 60°C. Po upływie tego czasu ochłodzić (nie otwierając) i zmierzyć absorbancję, wobec próby kontrolnej, przy długości fali 625 nm.

5. Opracowanie wyników

Na podstawie otrzymanych wyników w jednym układzie współrzędnych przedstawić wykresy zależności absorbancji od czasu inkubacji dla wszystkich czterech układów reagujących.

Zwrócić uwagę na różnice w aktywności *glutaminazy* w mięśniu szkieletowym i w nerce.

Zużycie glukozy w mózgu

Cel ćwiczenia: *ocena zużycia glukozy przez cytosol mózgowy oraz ocena wpływu kofaktorów i inhibitorów glikolizy na ten proces*

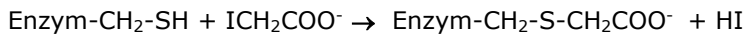
Glukoza jest jednym z głównych substratów energetycznych. Zasadniczą drogą metabolizmu tego cukru w komórkach zwierzęcych jest jego przemiana do **pirogonianu**. Proces ten zachodzi w cytosolu. W warunkach tlenowych pirogonian przechodzi do mitochondriów, gdzie ulega oksydacyjnej dekarboksylacji do **acetylo~S-CoA**. Reszty acetylowe mogą utleniać się w cyklu kwasów trikarboksylowych do **CO₂ i H₂O**, dostarczając komórce energii lub stanowić substrat do biosyntezy, zachodzących zarówno w mitochondriach jak i w cytoplazmie. W warunkach beztlenowych nie jest możliwa oksydacyjna dekarboksylacja pirogonianu, ani funkcjonowanie cyklu kwasów trikarboksylowych z powodu braku tlenu, jako ostatecznego akceptora protonów i elektronów odłączanych od substratów energetycznych.

W warunkach beztlenowych, w trakcie przemiany glukozy do pirogonianu, w jednym z etapów następuje utlenienie aldehydu 3-fosfoglicerynowego do kwasu 1,3-*bis*-fosfoglicerynowego. Akceptorem protonu i elektronów jest cytosolowy NAD⁺, który przechodzi w formę zredukowaną: NADH+H⁺. W cytosolu wyczerpują się zapasy NAD⁺, gromadzi się NADH+H⁺. Utlenianie kolejnych cząsteczek aldehydu 3-fosfoglicerynowego wymaga odtworzenia NAD⁺ w sposób niezależny od łańcucha oddechowego. Jest to możliwe poprzez przekazanie protonów i elektronów z NADH+H⁺ na pirogonian z wytworzeniem mleczanu i odtworzeniem NAD⁺. Reakcję tę katalizuje *dehydrogenaza mleczanowa*, obecna w cytosolu.

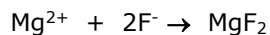
Mózg jest narządem, który (w warunkach zdrowia) czerpie energię wyłącznie z utleniania glukozy do CO₂ i H₂O. Przedmiotem ćwiczenia jest ocena wpływu kofaktorów i inhibitorów glikolizy na metabolizm glukozy w cytosolu mózgu szczura. Doświadczenie polega na inkubacji cytosolu mózgu szczura z glukozą w środowisku o różnym składzie, w obecności lub nieobecności: ATP, NAD⁺, jodooctanu, fluorku i cytrynianu. Do doświadczenia użyjemy cytosolu uzyskanego z mózgu szczurzego. Brak mitochondriów (zostały odwirowane) uniemożliwia tlenową przemianę glukozy do CO₂ i H₂O. Glukoza inkubowana z takim ekstraktem może ulegać jedynie przemianie

beztlenowej do mleczanu. Niezbędnym warunkiem tej przemiany jest obecność ATP i NAD⁺. Jodooctan, fluorek i cytrynian hamują ten proces.

Jodooctan jest inhibitorem niekompetycyjnym *dehydrogenazy 3-fosfogliceroaldehydowej*. Wiąże się on kowalencyjnie z siarką grup -SH miejsca aktywnego tego enzymu.



Jon fluorkowy (F⁻) hamuje aktywność enolazy poprzez wiązanie jonu magnezowego (Mg²⁺), niezbędnego do funkcjonowania tego enzymu.



Cytrynian hamuje glikolizę, gdyż jest efektem allosterycznym ujemnym *fosfofruktokinazy*.

W przebiegu glikolizy zmniejsza się zawartość glukozy. W ćwiczeniu oznacza się ilość pozostałej glukozy metodą ortotoluidynową. Polega ona na reakcji glukozy z ortotoluidyną, podczas krótkiego ogrzewania w środowisku kwasu octowego. Powstaje niebieski produkt. Intensywność barwy koreluje z zawartością glukozy.

Wykonanie

1. Preparatyka cytosolu z mózgu szczura

Wypreparować mózgi trzech szczurów i homogenizować je starannie w 8 ml zimnego, zbuforowanego roztworu KCl, przy użyciu homogenizatora tłokowego. Homogenat przelać do probówki wirowniczej. Wirować przez 10 minut, w temperaturze 4°C, z prędkością 15.000 obrotów na minutę. Supernatant, zawierający rozpuszczalną część cytoplazmy, zwaną **cytosolem**, przelać do probówki.

2. Przygotowanie mieszanin inkubacyjnych

Rozpuścić 32 mg glukozy w 5 ml 50mM buforu Tris-HCl o pH 7,5 zawierającego: 30mM KH_2PO_4 , 60mM nikotynamid i 10mM MgCl_2 . Powstaje roztwór glukozy o stężeniu 35mM.

W probówkach wirowniczych (**0-7**) sporządzić mieszaniny inkubacyjne o składzie przedstawionym w Tabeli I. Poszczególne składniki mieszaniny należy wprowadzać na dno probówki.

Tabela I. Skład mieszanin inkubacyjnych (objętości w ml)

Nr próby	Mieszanka inkubacyjna (ml)						
	35mM glukoza	10mM ATP	10mM NAD^+	H_2O red.	50mM jodoocetan	100mM NaF	50mM cytrynian
0	0,1	0,05	0,05	0,05	-	-	-
1	0,1	0,05	0,05	0,05	-	-	-
2	0,1	0,05	0,05	0,05	-	-	-
3	0,1	-	0,05	0,1	-	-	-
4	0,1	0,05	-	0,1	-	-	-
5	0,1	0,05	0,05	-	0,05	-	-
6	0,1	0,05	0,05	-	-	0,05	-
7	0,1	0,05	0,05	-	-	-	0,05

3. Inkubacja

Do probówki oznakowanej **0** dodać 0,25 ml 1M roztworu kwasu trichlorooctowego. Do wszystkich probówek (**0-7**) dodać po 0,25 ml cytosolu mózgowego i inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 40 minut. Przerwać reakcję przez dodanie do probówek **1-7** po 0,25 ml 1M roztworu kwasu trichlorooctowego.

W czasie inkubacji wyliczyć końcowe stężenia składników mieszaniny inkubacyjnej i wpisać je do Tabeli II.

Tabela II.

Składnik mieszaniny inkubacyjnej	Stężenie [mM]
Glukoza	
Mg ²⁺	
ATP	
NAD ⁺	
H ₂ PO ₄ ⁻	
Jodooctan	
NaF	
Cytrynian	

4. Oznaczanie glukozy

Po 5 minutach od momentu zakończenia dodawania kwasu trichlorooctowego należy wszystkie próby starannie wytarować, a następnie wirować przez 10 minut, przy 2000 obrotów na minutę. Po odwirowaniu z każdej próbówki pobrać pipetą po 0,25 ml supernatantu i przenieść na dno wysokich probówek z korkiem (odpowiednio oznakowanych). Następnie do każdej z nich dodać po 2 ml odczynnika ortotoluidynowego (ortotoluidyna w stężonym kwasie octowym). Wszystkie próbówki, zamknięte korkami, wstawić na 8 minut do wrzącej łaźni wodnej, a następnie ochłodzić. Zaobserwować powstanie barwnego produktu reakcji i zróżnicowanie natężenia barwy w zależności od składu mieszaniny reagującej. Oznaczyć absorbancję poszczególnych prób w kolorymetrze przy długości fali 630 nm, wobec wody.

Obliczyć w procentach zużycie (ubytek) glukozy w poszczególnych próbach. Przyjmujemy, że w próbie kontrolnej **0** zużycie glukozy wynosi 0%. Zużycie glukozy obliczamy według poniższego wzoru:

$$\text{Zużycie glukozy} = \frac{(A_0 - A_n)}{A_0} \times 100\%$$

A_0 - absorbancja próby "0"

A_n - absorbancja próby o numerze "n" (wg Tabeli III)

Wyniki przedstawić w Tabeli III:

Tabela III. Zużycie glukozy w poszczególnych próbach

Nr próby (n)	A_{630}	$A_0 - A_n$	Zużycie glukozy [%]
0		0	0
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

Interpretując wyniki przeprowadzonego doświadczenia należy ocenić zależność zużycia glukozy od obecności kofaktorów i inhibitorów glikolizy.

Ocenić:

- wpływ ATP i NAD^+
- wpływ cytrynianu, jodooctanu i fluorku.

Synteza i rozkład glikogenu

Cel ćwiczenia: obserwacja syntezy i rozkładu glikogenu

Glikogen jest zapasowym materiałem energetycznym, magazynowanym głównie w wątrobie i w mięśniach. Jest rozgałęzionym homopolisacharydem złożonym z reszt α -D-glukozy, połączonych wiązaniami glikozydowymi. Odcinki proste zawierają reszty glukozy zespolone wiązaniami α -1,4, natomiast rozgałęzienia powstają poprzez wiązania glikozydowe α -1,6. Na 8-10 reszt glukozy wbudowywanych do łańcucha prostego przypada jedno rozgałęzienie. Rozgałęzienia te są wielostopniowe. Wysoki stopień rozgałęzienia łańcuchów glikogenu ułatwia pełnienie jego funkcji. Poprawia bowiem rozpuszczalność tego polisacharydu i zwiększa liczbę końcowych reszt glukozy, które (zależnie od potrzeby) mogą być uwalniane, lub mogą służyć jako akceptor dla następnych cząsteczek tego monosacharydu. **Glikogen** pełni funkcję **rezerwuaru glukozy**. Ilość zmagazynowanej glukozy w postaci glikogenu jest w równowadze dynamicznej, szybko zmieniającej się zależnie od stanu całego organizmu, jak i syntetyzujących go narządów: mięśni i wątroby. Wysokie stężenie glukozy we krwi (w stanie sytości) sprawia, iż jest ona wychwytywana przez komórki wątrobowe i mięśniowe, a następnie wbudowywana do glikogenu.

Przy obniżeniu stężenia glukozy we krwi (w stanie hipoglikemii) nasila się rozpad glikogenu wątrobowego do wolnej glukozy, która przenika do krwi, pozwalając na osiągnięcie przejściowego stanu normoglikemii. Glukoza pochodząca z tego źródła jest transportowana z krwią i wychwytywana przez komórki różnych narządów. Stąd wątroba jest magazynem tego substratu energetycznego dla innych tkanek.

Komórki mięśniowe magazynują glukozę w formie glikogenu na własne potrzeby. Glikogen jest rozkładany podczas dużego zapotrzebowania na glukozę, np. podczas wysiłku.

Synteza glikogenu w obu tkankach przebiega w ten sam sposób. Jest to proces wieloetapowy. Do jej zainicjowania, oprócz glukozy, niezbędny jest fragment pełniący funkcję startera tej reakcji. Jest on łatwo dostępny w komórce, w której zapas glikogenu nie został do końca wyczerpany. W przypadku braku startera, pochodzącego z rozpadu wcześniej istniejącej cząsteczki glikogenu, musi on być syntetyzowany *de novo*. Istnieje

specyficzne białko – **glikogenina**, służące za akceptor reszt glukozy. Przeniesienie pierwszej cząsteczki glukozy z UDP-glukozy do glikogeniny jest katalizowane przez *syntazę startera glikogenu*. Glikogenina może przyłączać kolejne reszty glukozy z UDP-glukozy i powstaje krótki łańcuch oligosacharydowy (starter), który staje się akceptorem kolejnych reszt glukozy. Szereg enzymów przekształca glukozę do glukozo-6-fosforanu, następnie do glukozo-1-fosforanu i UDP-glukozy. W trakcie tych przemian uwalniane są reszty fosforanowe, których ilość może być miarą szybkości biosyntezy glikogenu.

Zasada oznaczania fosforanów nieorganicznych polega na reakcji fosforanu z molibdenianem amonu (VI). Powstały fosfomolibdenian przekształca się w "błękit molibdenowy" (mieszaninę tlenków molibdenu na niższym stopniu utlenienia) przy udziale reduktora, którym jest eikonogen (roztwór kwasu 1-amino-2-naftolo-4-sulfonowego w 12% pirosiarczynie sodu i 1,2% siarczanie (IV) sodu).

W końcowych etapach **syntaza glikogenowa** wydłuża łańcuchy glikogenu, w wyniku przyłączania glukozy z UDP-glukozy do nieredukującego końca rosnącego łańcucha. Produktem elongacji, jest liniowy, nierozgałęziony łańcuch glikogenowy złożony z reszt glukozy połączonych wyłącznie wiązaniami α -1,4. Rozgałęzienia łańcucha glikogenowego powstają pod działaniem **1,4-1,6-transglukozydazy**, zwanej także *enzymem rozgałęziającym*.

Rozkład glikogenu przebiega na drodze fosforolitycznej przy udziale **fosforylasy glikogenowej** i fosforanu nieorganicznego. *Fosforylaza glikogenowa* występuje w formie **a** – **aktywnej** (ufosforylowanej) oraz w formie **b** – **nieaktywnej** (nieufosforylowanej). Produkt fosforolizy - glukozo-1-fosforan jest przekształcany do glukozo-6-fosforanu, który w mięśniach jest włączany do glikolizy. Natomiast w komórkach wątrobowych występuje dodatkowy enzym – *glukozo-6-fosfataza*, uwalniający glukozę z glukozo-6-fosforanu. Dzięki temu wolna glukoza przenika przez błonę komórkową do krwi i jest dostarczana do innych narządów. Mechanizmem wspomagającym fosforolizę jest rozpad hydrolityczny.

Stymulatorem rozkładu glikogenu jest nie tylko niskie stężenie glukozy, ale również duża zawartość 5'-AMP. W mięśniach (w odróżnieniu od wątroby) 5'-AMP powoduje aktywację fosforylasy, niezależnie od ufosforylowania enzymu.

Proces rozkładu glikogenu można ocenić poprzez oznaczenie ilości uwolnionej glukozy, metodą ortotoluidynową, opisaną w ćwiczeniu **Zużycie glukozy w mózgu**.

W y k o n a n i e

I. Przygotowanie homogenatów mięśni szkieletowych i wątroby szczura

Wypreparować mięśnie szkieletowe tylnych łap szczura oraz wątrobę i umieścić je w zlewkach z oziębionym 0,9% roztworem NaCl. Zważyć dwa razy po 1 g każdej z tkanek do nowych, suchych zlewek i rozdrobnić je nożyczkami. Następnie zhomogenizować w 5 ml oziębionego 0,9% roztworu NaCl.

II. Ocena syntezy glikogenu

1. Przygotować 8 probówek wirowniczych o pojemności 1,5 ml (typu Eppendorf) oznakowanych w następujący sposób:

WA – 0	WA – 20	MA – 0	MA – 20
WB – 0	WB – 20	MB – 0	MB – 20

Litery oznaczają tkanki (W – wątroba, M – mięśnie) i układy reagujące (A, B), a cyfry oznaczają czas inkubacji w minutach.

Do wszystkich probówek dodać po 0,5 ml 7% roztworu kwasu chlorowego (VII).

2. Przygotowanie prób do inkubacji

Przygotować 4 probówki inkubacyjne (plastikowe, o pojemności 10 ml) opisane:

WA i WB – dla homogenatu wątroby

MA i MB – dla homogenatu mięśni szkieletowych

Do probówek inkubacyjnych odmierzyć odczynniki według tabeli:

Układ reagujący	A	B
0,3M roztwór glukozy-1-fosforanu	50 µl	200 µl
H ₂ O destylowana	150 µl	-

Układ reagujący **A** ocenia podstawową biosyntezę glikogenu, a układ **B** ocenia wpływ wzrostu stężenia substratu na biosyntezę glikogenu.

3. Inkubacja

Wszystkie probówki inkubacyjne wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C w celu ogrzania reagujących roztworów do tej temperatury. Następnie do probówek inkubacyjnych układu **W** dodać po 1,5 ml homogenatu wątroby, wymieszać i natychmiast pobrać po 0,5 ml próby, przenieść do uprzednio przygotowanych probówek wirowniczych oznaczonych symbolem **W0** i dokładnie wymieszać.

Do probówek inkubacyjnych układu **M** dodać po 1,5 ml homogenatu mięśni, wymieszać i natychmiast pobrać po 0,5 ml próby, przenieść do uprzednio przygotowanych probówek wirowniczych oznaczonych symbolem **M0** i dokładnie wymieszać.

Następnie wszystkie próby inkubować dalej przez 20 minut w łaźni wodnej w temperaturze 37°C często mieszając. Po upływie tego czasu pobrać po 0,5 ml próby, przenieść do uprzednio przygotowanych probówek wirowniczych oznaczonych odpowiednimi symbolami (**W20** i **M20**) i dokładnie wymieszać.

4. Oznaczenie fosforanu nieorganicznego

Wszystkie pobrane próby układu **A** i **B** wirować przez 5 minut przy 3.000 obr./min. Po odwirowaniu, pobrać po 50 mikrolitrów supernatantu, przenieść do czystych, odpowiednio oznakowanych szklanych probówek, a następnie dodać (w podanej kolejności): 2,5 ml wody destylowanej, 1,5 ml 10% kwasu trichlorooctowego – TCA (zwrócić uwagę aby dodać roztwór kwasu o właściwym stężeniu), 0,5 ml odczynnika molibdenowego oraz 0,2 ml eikonogenu. Próbę należy dokładnie wymieszać. Jednocześnie przygotować

próbę kontrolną, składającą się z: 2,5 ml wody destylowanej, 1,5 ml 10% TCA, 0,5 ml odczynnika molibdenowego oraz 0,2 ml odczynnika z eikonogenem (wymieszać próby).

Wszystkie próby pozostawić w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po upływie tego czasu odczytać absorbancję poszczególnych prób w kolorymetrze przy długości fali 690 nm wobec próby kontrolnej.

5. Opracowanie wyników

Obliczyć ilość uwolnionego fosforanu na podstawie poniższego wzoru:

$$\text{Ilość fosforanu} = 177 \times (A_{20} - A_0) \text{ [mikromole / g tkanki]}$$

177 - współczynnik liczbowy, uwzględniający molowy współczynnik kalibracji oraz sposób przygotowania homogenatu i próby.

III. Ocena degradacji glikogenu

1. **Przygotować 8 probówek wirowniczych**, o pojemności 1,5 ml (typu Eppendorf) oznakowanych w następujący sposób:

WC – 0	WC – 20	MC – 0	MC – 20
WD – 0	WD – 20	MD – 0	MD – 20

Litery oznaczają tkanki (W – wątroba, M – mięśnie) i układy reagujące (C, D), a cyfry oznaczają czas inkubacji w minutach.

Do wszystkich probówek wirowniczych dodać po 0,5 ml 20% roztworu kwasu trichlorooctowego – TCA (zwrócić uwagę aby dodać roztwór kwasu o właściwym stężeniu).

2. Przygotowanie prób do inkubacji

Przygotować 4 probówki inkubacyjne (plastikowe, o pojemności 10 ml) opisane:

WC i WD – dla homogenatu wątroby,
MC i MD – dla homogenatu mięśni szkieletowych.

Do probówek inkubacyjnych odmierzyć odczynniki według tabeli:

Układ reagujący	C	D
10% roztwór glikogenu	100 µl	100 µl
40 mM roztwór AMP	-	100 µl
H ₂ O destylowana	100 µl	-

Układ reagujący **C** ocenia podstawową degradację glikogenu, a układ **D** ocenia wpływ AMP na degradację glikogenu.

3. Inkubacja

Wszystkie probówki inkubacyjne wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C w celu ogrzania próbek. Następnie do wszystkich probówek inkubacyjnych układu reagującego **W** dodać po 1,5 ml homogenatu wątroby, wymieszać i natychmiast pobrać po 0,5 ml próby do uprzednio przygotowanych probówek wirowniczych oznaczonych symbolem **W0** i dokładnie wymieszać.

Do wszystkich probówek inkubacyjnych układu **M** dodać po 1,5 ml homogenatu mięśni, wymieszać i natychmiast pobrać po 0,5 ml próby do uprzednio przygotowanych probówek wirowniczych oznaczonych symbolem **M0** i dokładnie wymieszać.

Następnie wszystkie próby inkubować dalej przez 20 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C często mieszając. Po upływie tego czasu pobrać po 0,5 ml próby do odpowiednich probówek wirowniczych oznaczonych **W20**, **M20** i dokładnie wymieszać.

4. Oznaczenie ilości glukozy

Wszystkie próbki wirownicze układu **C** i **D** odstawić na 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próby te wirować przez 5 minut przy 3.000 obr./min. Po odwirowaniu pobrać po 0,5 ml supernatantu i przenieść do czystych, odpowiednio oznaczonych próbówek z korkiem. Dodać 2 ml odczynnika ortotoluidynowego, zamknąć, wymieszać i wstawić do wrzącej łąźni wodnej na dokładnie 8 minut. Następnie próby ochłodzić (bez otwierania) i oznaczyć absorbancję w kolorymetrze przy długości fali 630 nm wobec wody destylowanej (przy zbyt wysokich absorbancjach próby rozcieńczyć dodając po 2,5 ml wody destylowanej).

5. Opracowanie wyników

Obliczyć ilości uwolnionej glukozy na podstawie poniższego wzoru:

$$\text{Ilość glukozy} = 74 \times (A_{20} - A_0) \text{ [mikromole / g tkanki]}$$

74 - współczynnik liczbowy uwzględniający molowy współczynnik kalibracji oraz sposób przygotowania homogenatu i próby

IV. Analiza wyników

Na podstawie uzyskanych wyników przedyskutować przebieg syntezy i rozkładu glikogenu w obu badanych narządach. Ocenić wpływ stężenia substratu i AMP na przebieg tych reakcji.

Synteza i rozkład skrobi

Cel ćwiczenia: obserwacja przebiegu syntezy i rozkładu skrobi

Skrobia jest polisacharydem zbudowanym z wielu reszt glukozy, połączonych wiązaniami α -glikozydowymi. W świecie roślinnym pełni funkcję zapasowego substratu energetycznego. Składa się z dwóch frakcji: **amylozy** i **amylopektyny**. Amyloza tworzy łańcuchy proste. Pomiedzy resztami glukozy występują wyłącznie wiązania α -1,4-glikozydowe. Amylopektyna jest polisacharydem rozgałęzionym. Oprócz wiązań α -1,4-glikozydowych posiada wiązania α -1,6-glikozydowe, tworzące rozgałęzienia łańcucha polisacharydowego. Masa cząsteczkowa łańcuchów skrobi jest bardzo różnicowana i waha się od 2 do 20 kDa.

Charakterystyczną właściwością skrobi jest **reakcja z jodem**. Stosuje się odczynnik zwany płynem Lugola, który zawiera I_2 w roztworze KI. Cząsteczki skrobi skupiają wolny jod na swojej powierzchni. Amyloza barwi się jodem na kolor niebieski, a amylopektyna na fioletowy.

Fosforolityczny rozkład skrobi w tkankach roślinnych katalizuje **fosforolaza skrobiowa**. Pod działaniem tego enzymu i przy udziale nieorganicznego fosforanu odłączają się kolejno pojedyncze reszty glukozy od strony nieredukującego końca łańcucha skrobi. Grupa $-OH$ przy węglu anomerycznym (C-1) glukozy, powstała w wyniku rozpadu wiązania glikozydowego, wiąże się z fosforanem. Powstaje glukozo-1-fosforan. Rozpad wiązania estrowego w środowisku alkalicznym i towarzysząca temu procesowi zamiana formy pierścieniowej glukozy w formę łańcuchową sprawia, iż w pozycji C¹ pojawia się grupa aldehydowa o właściwościach redukujących.

Cukry redukujące można wykryć próbą z odczynnikiem Benedicta. Wodorotlenek miedzi (II) - $Cu(OH)_2$, ulega redukcji do pomarańczowego tlenku miedzi (I) - Cu_2O . Próbę należy ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej. W przypadku obecności cukrów redukujących powstaje pomarańczowy osad tlenku miedzi (I). Intensywność barwy zależy od zawartości cukrów redukujących w badanej próbce.

Synteza skrobi w tkankach roślinnych może zachodzić poprzez odwrócenie reakcji fosforolizy. W trakcie tego procesu reszta glukozy jest pobierana z glukozy-1-fosforanu i przenoszona na akceptor, zwany starterem. Rolę startera pełni istniejący już fragment oligo- lub polisacharydowy, którego nieredukujący koniec jest wydłużany poprzez przyłączanie kolejnych reszt glukozy, pochodzących z glukozy-1-fosforanu. Produkt syntezy można wykryć drogą reakcji z płynem Lugola. Charakterystyczna dla skrobi barwa fioletowo-niebieska (pojawiająca się wkrótce po dodaniu płynu Lugola) nasila się w miarę postępu reakcji syntezy tego polisacharydu.

Synteza skrobi poprzez odwrócenie reakcji fosforolizy ma *in vivo* znaczenie drugorzędne. Główny szlak syntezy tego polisacharydu przebiega przy udziale UDP-glukozy, podobnie, jak w przypadku syntezy glikogenu w wątrobie i w mięśniach.

Rozpad skrobi zachodzi również przy udziale **enzymów hydrolitycznych** - *amylaz*. Ze względu na sposób ich działania wyróżniamy α -*amylazę* i β -*amylazę*. Pierwsza z nich (α -*amylaza*) hydrolizuje wiązania α -1,4-glikozydowe wewnątrz łańcucha skrobi, tworząc w efekcie mieszaninę maltozy (disacharyd) i oligosacharydów (dekstryn). Druga z nich (β -*amylaza*) odłącza od skrobi cząsteczki maltozy od strony końca nieredukującego. Miarą postępu hydrolizy skrobi katalizowanej przez obie *amylazy* jest pojawienie się i narastanie ilości cukrów redukujących oraz stopniowy zanik zdolności rozpadającej się skrobi do interakcji z jodem.

W warunkach laboratoryjnych można przeprowadzić hydrolizę skrobi w rozcieńczonym kwasie siarkowym. Wraz z upływem czasu hydrolizy wzrasta ilość uwolnionej glukozy. Obserwuje się postępujący zanik reakcji z płynem Lugola (zużycie substratu) oraz narastanie intensywności prób redukcyjnych z odczynnikiem Benedicta (przyrost produktów hydrolizy).

W y k o n a n i e

1. Enzymatyczna synteza skrobi

a. preparatyka fosforylazy

Dwa czyste ziemniaki należy obrać i zetrzeć na tarce. Miazgę ziemniaczaną przenieść do moździerza i zalać 50 ml wody destylowanej. Po

dokładnym wymieszaniu, móżdziej z miazgą wstawić do zamrażarki na 10-15 minut, po czym miazgę wycisnąć w woreczku lnianym. Przesącz wirować przez 10 minut z szybkością 3000 obrotów na minutę. Płyn z nad osadu zawiera *fosforylaze*.

b. przygotowanie 2% roztworu glukozy-1-fosforanu

100 mg glukozy-1-fosforanu rozpuścić w 5 ml wody destylowanej.

c. obserwacja przebiegu syntezy skrobi

Do 1 ml roztworu fosforylazy dodać 1 ml 2% roztworu glukozy-1-fosforanu oraz nie więcej niż 2 krople 0,4% kleiku skrobiowego (starter reakcji) i wymieszać. Inkubację przeprowadzać w temperaturze pokojowej. W odpowiednich odstępach czasu: po 5 min., 15 min., 30 min., 45 min., 1 godz. i 1,5 godz. pobierać na szkiełko zegarkowe próbkę inkubowanej mieszaniny (2-3 krople) i dodawać 1-2 krople płynu Lugola.

2. Fosforoliza skrobi

Do próbki pobrać 10 ml 1,9% kleiku skrobiowego zawierającego bufor fosforanowy o pH 6,8. Dodać 2,5 ml świeżo przygotowanego roztworu *fosforylazy* (wyciągu z ziemniaka). Zawartość wymieszać. Pobrać 0,5 ml tej mieszaniny i wykonać próbę na obecność cukrów redukujących.

Pozostały płyn podzielić na dwie części. Do jednej części dodać 2 krople toluenu i pozostawić w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Drugą część ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut w celu inaktywacji *fosforylazy*, a następnie oziębnić. Dodać do niej 2 krople toluenu i pozostawić w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Obie próby należy odpowiednio oznaczyć.

Przebieg fosforolizy ocenić na następnym ćwiczeniu wykonując próby na obecność cukrów redukujących, opisanych w ćwiczeniu **Węglowodany**.

3. Hydroliza kwasowa skrobi

Przenieść do zlewki 30 ml 1,7% kleiku skrobiowego. Dodać do niego 0,5 ml stężonego H_2SO_4 i wymieszać. Kleik z kwasem ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej. Co 5 minut pobierać dwie próbki po 0,5 ml. Jedną zbadać na obecność skrobi – wykonać próbę z płynem Lugola, drugą zalkalizować

2M roztworem NaOH wobec papierka uniwersalnego i zbadać na obecność cukrów redukujących (próba Benedicta). Inkubację prowadzić aż do zakończenia hydrolizy.

4. Hydroliza enzymatyczna skrobi

a. preparatyka β -amylazy

Okolo 10 g suchego sŁodu z jęczmienia rozetrzeć w moździerzu, przenieść do kolbki stożkowej i zalać 60 ml wody destylowanej. Dokładnie wymieszać i pozostawić na 1 godzinę w temperaturze 37°C, a następnie przesączyć. Otrzymany wyciąg zawiera β -amylazę.

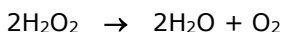
b. przebieg hydrolizy

Do wysokiej zlewki pobrać 25 ml 0,8% kleiku skrobiowego w buforze fosforanowym o pH 6,8. Dodać 0,25 ml 30% roztworu NaCl. Kleik ogrzać do temperatury 37°C i dodać 5 ml wyciągu β -amylazy. Mieszaninę inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Obserwować przebieg reakcji pobierając co 5 minut po 2 próbki o objętości 1 ml i wykonując równolegle próby na obecność skrobi (z płynem Lugola) i cukrów redukujących (z odczynnikiem Benedicta).

Katalaza - ćwiczenie stoiskowe

Cel ćwiczenia: *poznanie jednej z metod izolacji enzymu z materiału biologicznego i pomiar jego aktywności*

Katalaza jest enzymem należącym do klasy *oksydoreduktaz*. Jest hemoproteina, posiadającą 4 atomy żelaza. Enzym ten katalizuje rozkład nadtlenu wodoru do wody i tlenu, według równania:



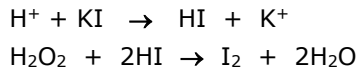
Funkcja biochemiczna **katalazy** polega na rozkładzie toksycznego nadtlenu wodoru, który powstaje przede wszystkim w trakcie utleniania aminokwasów przy udziale *oksydaz aminokwasowych*, współdziałających z mononukleotydem flawinowym (FMN) lub dinukleotydem flawino-adeninowym (FAD). **Katalaza** jest jednym z najbardziej aktywnych enzymów. Jest obecna w każdej komórce. Szczególnie duża zawartość tego enzymu występuje w wątrobie i krwinkach czerwonych.

Katalaza jest bardzo podatna na inhibicję. Już sam substrat (H_2O_2), zwłaszcza w większych stężeniach, powoduje inaktywację enzymu. Hamujące działanie wykazuje też szereg związków, które reagują z Fe^{3+} , np: cyjanki, azydki, fluorki. Kwas siarkowy natychmiast inaktywuje **katalazę** i przerywa reakcję rozkładu H_2O_2 .

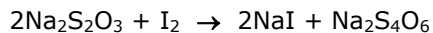
Aktywność enzymu mierzymy w warunkach zapewniających nadmiar substratu (reakcja rzędu zerowego), temperaturę 30°C , obecność kofaktorów oraz pH optymalne do jego działania. Aktywność **katalazy** wyraża się ilością H_2O_2 rozłożonego w jednostce czasu. Na początku reakcji (w czasie 0) w układzie reagującym znajduje się nadmiar substratu. W trakcie reakcji dochodzi do stopniowego zużycia substratu, a jednocześnie następuje powolna inaktywacja enzymu, dlatego w miarę upływu czasu prędkość reakcji maleje.

Oznaczamy zawartość H_2O_2 w układzie reagującym na początku reakcji - w czasie 0 i po jej przerwaniu kwasem siarkowym - w czasie t . Ilość pozostałego H_2O_2 w tak otrzymanych próbach oznaczamy jodometrycznie.

W tym celu należy dodać roztwór KI. W środowisku kwaśnym KI przechodzi w HI, a H₂O₂ utlenia HI do wolnego jodu. Funkcje katalizatora reakcji pełni kwas molibdenowy (VI).



Jeden mol H₂O₂ uwalnia 1 mol jodu cząsteczkowego. Wolny jod miareczkuje się tiosiarczanem sodu w obecności kleiku skrobiowego, barwiącego się jodem na kolor niebieski. Redukcja I₂ do 2I⁻ (kosztem utlenienia siarki zawartej w tiosiarczanie) powoduje odbarwienie roztworu.



Objętość zużytego mianowanego roztworu tiosiarczanu sodu pozwala obliczyć ilość H₂O₂ pozostałego w poszczególnych próbach. Różnica objętości roztworu tiosiarczanu zużytego na zmiareczkowanie próby 0 i t odpowiada ilości rozłożonego H₂O₂ w czasie t.

Aktywność katalazy wyrażamy w katalach (liczba moli substratu przekształconego w czasie 1 sekundy) lub w jednostkach międzynarodowych (liczba mikromoli substratu przekształconego w czasie 1 minuty). Przeliczając aktywność enzymu na gram tkanki należy uwzględnić rozcieńczenie *katalazy* w trakcie jej preparatyki.

Wykonanie

1. Preparatyka katalazy

Pięć gramów świeżej wątroby bydlęcej pociąć na drobne fragmenty i homogenizować w 10 ml H₂O przy użyciu homogenizatora tłokowego. Homogenat przelać do kolby stożkowej, dodać 5 ml mieszaniny alkoholowo-chloroformowej (1:1), szczelnie zamknąć i energicznie wstrząsać przez około 1 minutę. Większość białek zawartych w homogenacie wytrąci się. Otrzymaną zawiesinę odwirować z prędkością 2.000 obrotów na minutę przez 5 minut. *Katalaza* pozostanie w supernatancie (płynie nadosadowym). Zebrać supernatant, zmierzyć jego objętość (zapisać) i dodawać stopniowo, porcjami siarczan amonu w ilości 3 g na każde 10 ml supernatantu. Preparat należy ciągle mieszać aż do całkowitego rozpuszczenia dodawanej soli. *Katalaza* pod

działaniem siarczanu amonu wytrąca się z roztworu i przechodzi do osadu, który należy oddzielić przez ponowne wirowanie z prędkością 2.000 obrotów na minutę przez 15 minut. Supernatant odrzucić, a osad (zawierający *katalazę*) rozpuścić w 0,15M buforze fosforanowym (pH 7,2) o objętości równej ilości supernatantu otrzymanego podczas pierwszego wirowania. Uzyskany roztwór zawiera *katalazę*.

Enzym należy rozcieńczyć dwuetapowo wykorzystując dwie kolbki stożkowe o pojemności 50 ml. **Pierwsze** rozcieńczenie przygotować przez połączenie 1 ml roztworu *katalazy* z 19 ml 0,15M buforu fosforanowego (pH 7,2) i dokładnie wymieszać (rozcieńczenie 20-krotne). **Drugie**, końcowe rozcieńczenie przygotować przez zmieszanie 1 ml roztworu *katalazy* (rozcieńczonego 20-krotnie) z 19 ml tego samego buforu. W ten sposób uzyskuje się 400-krotne rozcieńczenie enzymu. Tak rozcieńczony enzym używać do pomiaru aktywności.

2. Pomiar aktywności katalazy

Przygotować 3 kolbki stożkowe (lub zlewki) o pojemności 100 ml i oznaczyć je symbolami: **0**, **2**, **4**. Do każdej z nich dodać po 5 ml 1M H₂SO₄. Przygotować zlewkę (wysoką, wąską) zawierającą 24 ml 10mM H₂O₂ w buforze fosforanowym i umieścić ją w łaźni wodnej o temperaturze 30°C na kilka minut w celu ogrzania roztworu do temperatury reakcji enzymatycznej. Następnie dodać do tej zlewki 1 ml 400-krotnie rozcieńczonego preparatu *katalazy*. Natychmiast po dodaniu wymieszać, pobrać 5 ml tej mieszaniny i przenieść do kolbki oznaczonej symbolem **0**. Następne próbki (5 ml) pobierać odpowiednio po **2** i **4** minutach od momentu pobrania próbki w czasie **0** i przenosić do kolbek oznaczonych symbolami **2** i **4**.

Następnie do każdej kolbki dodać po 1 ml 5% roztworu KI i 0,5 ml nasyconego roztworu kwasu molibdenowego (VI), wymieszać i odstawić na 3 minuty. Wydzielony I₂ miareczkować 2,5mM tiosiarczanem sodu dwuetapowo. Miareczkować do jasno-żółtego zabarwienia. Dodać 3 krople 0,1% kleiku skrobiowego. Pojawia się zabarwienie niebieskie. Miareczkować dalej 2,5mM roztworem tiosiarczanu sodu aż do całkowitego odbarwienia roztworu. Zanotować objętość zużytego roztworu tiosiarczanu sodu (od początku miareczkowania do całkowitego odbarwienia próby).

Aktywność enzymu należy wyrazić w mikrokatalach i w jednostkach międzynarodowych w przeliczeniu na 1 gram tkanki.

Poniższy przykład przedstawia sposób obliczania aktywności *katalazy*.

Na zmiareczkowanie H_2O_2 zawartego w próbie w czasie **0** zużyto np. 9,2 ml 2,5mM roztworu tiosiarczanu, a w próbie inkubowanej przez 2 minuty zużyto np. 5,4 ml tiosiarczanu. W ciągu 2 minut inkubacji przereagowała taka ilość nadtlenu wodoru, która odpowiada 3,8 ml ($9,2 - 5,4 = 3,8$) roztworu tiosiarczanu sodu.

Wiadomo, że jeden mililitr 2,5mM roztworu tiosiarczanu odpowiada jednemu mililitrowi 1,25mM roztworu nadtlenu wodoru. Należy uwzględnić, iż 1 ml 1,25 mM roztworu zawiera 1,25 mikromola H_2O_2 .

Z następującej proporcji można obliczyć liczbę mikromoli rozłożonego substratu:

$$\begin{array}{rcl} 1,0 \text{ ml } 2,5\text{mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 & - & 1,25 \text{ mikromola } \text{H}_2\text{O}_2 \\ 3,8 \text{ ml } 2,5\text{mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 & - & X \text{ mikromoli } \text{H}_2\text{O}_2 \end{array}$$

$$X = 4,75 \text{ mikromola } \text{H}_2\text{O}_2$$

Aby wyrazić aktywność enzymu w jednostkach międzynarodowych, należy liczbę mikromoli rozłożonego nadtlenu wodoru podzielić przez czas inkubacji w minutach. W tym przypadku aktywność będzie równa 2,375 ($4,75 : 2$) jednostek międzynarodowych.

Aby obliczyć aktywność tego enzymu w mikrokatalach, należy podzielić ilość rozłożonego substratu wyrażoną w mikromolach przez czas inkubacji wyrażony w sekundach ($4,75 \text{ mikromola}, 2 \text{ minuty} = 120 \text{ sekund}$). Obliczona aktywność wynosi około 0,04 mikrokatala, w przeliczeniu na 1 ml rozcieńczonego roztworu *katalazy*.

Wyjściowy preparat *katalazy* został rozcieńczony 400-krotnie. Aktywność wyjściową w 1 ml nierozcieńczonego roztworu *katalazy* obliczamy mnożąc uzyskany wynik przez 400 (rozcieńczenie enzymu). Z 5 g tkanki wątrobowej uzyskano np. 10 ml preparatu *katalazy*. Z powyższych względów aktywność *katalazy* zawartej w 1 g tkanki obliczamy mnożąc aktywność wyjściową przez 10 (początkowa objętość preparatu *katalazy* w ml) i dzieląc przez 5 (masa tkanki w gramach).

Filtracja żelowa - ćwiczenie stoiskowe

Cel ćwiczenia: zastosowanie filtracji żelowej (sączenia molekularnego) do rozdzielenia białek, pomiaru ich masy cząsteczkowej oraz odsalania roztworów białek

Filtracja żelowa zwana jest także sączeniem molekularnym lub chromatografią na sitach molekularnych. Jest to metoda rozdzielania substancji zawartych w roztworach, oparta na różnicach mas cząsteczkowych. Rozdział następuje podczas przepływu mieszaniny rozdzielanych substancji przez kolumnę wypełnioną porowatymi ziarnami specjalnie preparowanego dekstranu, znanego pod nazwą handlową **Sephadex / Sefadeks**.

Sefadeksy są nierozpuszczalne w wodzie, w roztworach soli oraz w roztworach rozcieńczonych kwasów i zasad. Nie mają one właściwości adsorpcyjnych, a ich hydrofilowy charakter i zdolność tworzenia żelu spowodowany jest obecnością olbrzymiej liczby grup hydroksylowych. Chemiczna modyfikacja dekstranu polega na częściowej hydrolizie i utworzeniu licznych wiązań poprzecznych pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami. Dzięki temu powstają usieciowane struktury trójwymiarowe. W zależności od warunków reakcji otrzymuje się preparaty o różnym stopniu usieciowania, pozwalającym na penetrowanie w głąb porowatych ziaren jedynie cząsteczek o określonej wielkości. Im słabiej usieciowany jest Sefadeks, tym chłonie więcej wody i tym większe cząsteczki mogą penetrować do wnętrza kanalików w jego ziarnach.

Tabela I przedstawia niektóre właściwości Sefadeksów różnych typów.

Tabela I.

Typ Sefadeksu	Wiązanie wody [ml/g]	Zakres frakcjonowania mas cząsteczkowych [m. cz. w daltonach]
G - 10	1,0	do 700
G - 15	1,5	do 1 500
G - 25	2,5	1 000 - 5 000
G - 50	5,0	1 500 - 30 000
G - 75	7,5	3 000 - 70 000
G - 100	10,0	4 000 - 150 000
G - 150	15,0	5 000 - 400 000
G - 200	20,0	5 000 - 800 000

Oprócz Sefadeksów typu G stosuje się inne sita molekularne. Sefadeks LH-20 (hydroksypropylowa pochodna Sefadeksu G-25) służy do rozdzielania substancji rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych (np. lipidów). Sepharose (Sefarozą) jest produktem usieciowania agarozy i służy do rozdzielania substancji o bardzo dużych masach cząsteczkowych. Sefarozą 4B rozdziela substancje o masach cząsteczkowych od 3×10^5 do 3×10^6 , a Sefarozą 2B substancje o masach od 2×10^6 do 25×10^6 . Frakcjonowanie na zasadzie sączenia molekularnego można przeprowadzić również na sitach molekularnych typu Bio-Gel (Bio-żel), zarówno naturalnych - agarozowych (Bio-żele typu A), jak i syntetycznych (Bio-żele typu P). Te ostatnie są kopolimerami akrylamidu i metyleno-bis-akrylamidu. Są one bardziej odporne na działanie enzymów bakteryjnych niż Sefadeksy.

Jeśli wypełni się Sefadeksem (lub innym żelem) kolumnę chromatograficzną i naniesie na jej szczyt mieszaninę substancji różniących się masą cząsteczkową, to związki o masie cząsteczkowej przekraczającej górną granicę zdolności rozdzielczej (wymienionej w Tabeli 1) przechodzą przez kolumnę bez zatrzymania się i pojawiają się najwcześniej w płynie wyciekającym z kolumny - wypływają się najmniejszą objętością płynu. Cząsteczki tych związków są większe od średnicy kanalików w ziarnach Sefadeksu, nie wnikają do nich i najkrótszą drogą opuszczają kolumnę. W przypadku białek o mniejszych masach cząsteczkowych obserwuje się

„opóźnianie” ich przejścia przez kolumnę i wymywanie większymi ilościami rozpuszczalnika. **Cząsteczki o mniejszych rozmiarach** wnikają do wnętrza kanalików w ziarnach i to tym głębiej, im mniejsze są ich wymiary w porównaniu ze średnicą kanalików Sefadeksu. Uwolnienie tych cząsteczek z wnętrza sieci przestrzennej Sefadeksu jest trudniejsze. Do ich wypłukania potrzeba większych objętości płynu.

Sefadeksy i inne sita molekularne służą do rozdzielania mieszanin substancji różniących się masami cząsteczkowymi, oddzielania związków wielocząsteczkowych od związków drobnocząsteczkowych (np. białka od soli nieorganicznych - odsalanie) oraz oznaczania mas cząsteczkowych - głównie peptydów i białek.

Przy **oznaczaniu mas cząsteczkowych** metodą sączenia molekularnego wykorzystuje się liniową zależność pomiędzy objętością elucyjną a logarytmem dziesiętnym masy cząsteczkowej białka. Nie wszystkie białka podlegają tej regule. Obowiązuje ona w odniesieniu do białek globularnych (o kształcie kulistym). Białka fibrylarne (o kształcie włókienkowym) nie w pełni odpowiadają tej zależności.

Do pomiaru mas cząsteczkowych należy użyć białek (lub innych substancji) o znanych masach cząsteczkowych i zmierzyć ich objętość elucyjną. Pojęcie to oznacza objętość płynu potrzebnego do wypłukania naniesionego białka z kolumny. Objętość elucyjna wzrasta wraz ze zmniejszaniem się masy cząsteczkowej białka. Kolejność pojawiania się białek w płynie wyciekającym z kolumny (eluacie) obserwuje się za pomocą metod analitycznych, służących do wykrywania i ilościowego oznaczania białek. Najczęściej dokonuje się pomiaru absorpcji światła o długości fali 280 nm.

Mierzy się objętości elucyjne białek o znanej masie cząsteczkowej i sporządza się wykres zależności pomiędzy logarytmem dziesiętnym masy cząsteczkowej a objętością elucyjną (krzywa kalibracyjna). Na osi rzędnych oznacza się logarytmy dziesiętne mas cząsteczkowych, a na osi odciętych ich objętości elucyjne w mililitrach. Następnie mierzy się objętość elucyjną białka o nieznannej masie cząsteczkowej i zaznacza się jej wartość na osi odciętych. Z krzywej kalibracyjnej odczytuje się logarytm dziesiętny masy cząsteczkowej, odpowiadający objętości elucyjnej badanego białka, a następnie oblicza się jego masę cząsteczkową.

Przy **rozdzielaniu mieszanin** związków różniących się masą cząsteczkową należy dobrać odpowiedni Sefadeks (Sefarozę lub Bio-żel). Jego zdolność rozdzielcza powinna obejmować różnice mas cząsteczkowych składników rozdzielanej mieszaniny. Jeżeli celem sączenia molekularnego jest oddzielenie białka od związków drobnocząsteczkowych, należy posłużyć się żelami o niskich numerach. Wielkocząsteczkowe białka przechodzą wtedy przez kolumnę nie wnikając w kanaliki ziaren Sefadeksu, natomiast drobnocząsteczkowe sole „wpadają” w kanaliki i wypłukują się z opóźnieniem. Mówiąc inaczej białka wypłukują się małą objętością, a sole dużą objętością płynu.

Odsalanie roztworu białka za pomocą sączenia na Sefadeksie jest wielokrotnie szybsze od innych metod stosowanych do oddzielania drobnocząsteczkowych soli od wielkocząsteczkowych białek. Odsalanie prowadzi się na kolumnach wypełnionych Sefadeksem G-25. W przypadku odsalania białek rozpuszczalnych w wodzie, jako rozpuszczalnika używa się wody destylowanej.

W y k o n a n i e

1. Pomiar masy cząsteczkowej cytochromu C

Na szczyt kolumny o wymiarach 2×40 cm, wypełnionej Sefadeksem G-100 i przepłukanej 0,05M roztworem wodorowęglanu amonu, nanieść całość mieszaniny zawierającej:

0,2 ml roztworu hemoglobiny (m. cz. 68 000 Da)

0,2 ml roztworu cytochromu C

0,1 ml roztworu błękitu metylenowego (m. cz. 250 Da)

Po naniesieniu mieszaniny na szczyt żelu należy wypłukać jej składniki. Początkowo na szczyt żelu nanosić małe objętości płynu eluującego (2-3 razy po około 1 ml), a następnie podłączyć kolumnę do naczynia z tym płynem (0,05M NH_4HCO_3). **Nie wolno dopuścić do „zapowietrzenia” kolumny - żel powinien być stale pokryty płynem.** Eluat wyciekający z kolumny zbierać do cylindra miarowego do chwili ukazania się hemoglobiny (barwa czerwono-pomarańczowa). Następnie zbierać frakcje po 2 ml do chwili opuszczenia przez kolumnę błękitu metylenowego. Ocenić wizualnie, w której

próbówce jest maksymalne stężenie hemoglobiny, cytochromu C (barwa różowa) oraz błękitu metylenowego (barwa niebieska). Wylczyć objętości elucyjne poszczególnych substancji. Uzyskane wyniki przedstawić w Tabeli II.

Tabela II.

Substancje rozdzielane	Masa cząsteczkowa [Da]	Logarytm masy cząsteczkowej	Objętość elucyjna [ml]
Hemoglobina	68 000	4,833	
Błękit metylenowy	250	2,398	
Cytochrom C			

Sporządzić wykres kalibracyjny zależności objętości elucyjnych substancji wzorcowych od logarytmu dziesiętnego ich masy cząsteczkowej. Odczytać logarytm masy cząsteczkowej cytochromu C (badanego białka) i obliczyć jego masę cząsteczkową.

2. Odsalanie roztworu albuminy

Na kolumnę z Sefadexem G-25 (1×40 cm), przemytą wodą destylowaną, ostrożnie nanieść pipetą roztwór zawierający:

0,5 ml roztworu albuminy

0,3 ml roztworu chromianu (VI) potasu

U wylotu kolumny podstawić probówkę i otworzyć dolny zacisk. Po wnikięciu całej próby w żel, przemywać kolumnę niewielką ilością wody destylowanej (2×1 ml), a następnie stale dodawać wodę większymi porcjami. **Nie wolno dopuścić do „zapowietrzenia” kolumny - żel powinien być stale pokryty płynem.**

Zbierać frakcje o objętości około 2,5 ml, aż do całkowitego wypłukania chromianu (VI) potasu (barwa żółta). Ustalić miejsce barwnego chromianu, a następnie z każdą frakcją wykonać próbę na obecność białka, przez dodanie 0,5 ml 20% kwasu trichlorooctowego. W probówkach zawierających białko pojawi się zmętnienie bądź osad. Zaobserwować rozdzielenie białka od soli.

Azot białkowy, transaminacja aminokwasów - ćwiczenie stoiskowe

Cel ćwiczenia: I - poznanie metody pomiaru zawartości azotu w surowicy krwi

II - wykazanie aktywności aminotransferazy glutaminianowej w mięśniu sercowym

W tkankach i płynach ustrojowych głównymi związkami wielkocząsteczkowymi zawierającymi azot są białka. W innych związkach wielkocząsteczkowych zawartość azotu jest nieznaczna. Istnieje pojęcie „**azot białkowy**”, które oznacza azot zawarty w grupach aminowych i amidowych aminokwasów oraz w pierścieniach: tryptofanu, histydyny, proliny i hydroksyproliny – wbudowanych w łańcuch białkowy. Zawartość azotu w różnych białkach jest dość stała i wynosi około 16% masy białka. Z tego powodu pomiar zawartości azotu w materiale niezawierającym innych związków azotowych może być przydatny do ilościowego oznaczania białka. Mnożąc oznaczoną ilość azotu przez 6,25 otrzymujemy ilość białka w badanym materiale biologicznym.

Osobną grupę związków stanowi tzw. „**azot niebiałkowy**”. Nazwę tę stosuje się na sumaryczne określenie drobnocząsteczkowych składników osocza lub surowicy krwi – zawierających azot. Obejmuje ona przede wszystkim: mocznik, kwas moczowy, kreatynę, kreatyninę oraz wolne aminokwasy i oligopeptydy. W celu oznaczenia „azotu białkowego” osocza oraz „azotu niebiałkowego” należy najpierw oddzielić białka od wymienionych związków drobnocząsteczkowych. Można to osiągnąć np. drogą sączenia molekularnego, lub poprzez wytrącenie białka odpowiednimi stężeniami soli.

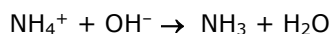
Głównym nośnikiem azotu są **grupy aminowe** aminokwasów. W trakcie degradacji aminokwasów mogą one odłączać się w postaci amoniaku (NH_3), lub mogą być przenoszone na ketokwasy. Amoniak w większości jest włączany do cyklu mocznikowego i w postaci mocznika jest wydalany z organizmu. Natomiast grupy aminowe przeniesione na ketokwasy tworzą wraz z nimi nowe aminokwasy, które mogą ponownie wbudować się do białka. Dzienny "obrót" białka w organizmie człowieka o masie ciała 70 kg wynosi około 400 g. Z tego około 100 g ulega degradacji i ilość ta musi być zastąpiona aminokwasami dostarczanymi z pożywieniem. Pozostałe są

wykorzystane do resyntezy (ponownej syntezy) białka lub służą za substraty do syntezy innych biomolekuł.

Miarą obrotu metabolicznego białek jest **bilans azotowy**. Jest to porównanie ilości azotu przyswojonego w ciągu doby do ilości azotu wydalonego. Bilans azotowy może być: **zrównoważony** – gdy ilości azotu przyswojonego i wydalonego są sobie równe, **dodatni** – gdy ilość azotu przyswojonego jest większa od ilości azotu wydalonego, bądź **ujemny** – gdy ilość azotu przyswojonego jest mniejsza od ilości azotu wydalonego.

I. Pomiar zawartości azotu w surowicy krwi metodą Kjeldahla

Podczas ogrzewania związków organicznych w obecności stężonego kwasu siarkowego (VI), ich szkielety węglowodorowe spalają się do CO₂ i H₂O, natomiast azot, uwalniający się w postaci amoniaku, jest wiązany przez stężony kwas siarkowy tworząc siarczan amonu - (NH₄)₂SO₄. Pod działaniem stężonego NaOH jon amonowy (NH₄⁺) jest wypierany przez jon sodowy (Na⁺). W reakcji z zasadą jon amonowy oddaje proton przechodząc w wolny amoniak (NH₃).



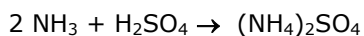
Uwolniony amoniak można oddestylować i związać z kwasem borowym (III). Powstanie boran amonu. Ilość związanego amoniaku oznaczamy przez miareczkowanie mianowanym roztworem H₂SO₄. Jony siarczanowe wypierają jony boranowe.

Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla dzieli się na **3 etapy**: mineralizację, destylację i miareczkowanie.

1. Mineralizacja

Mineralizację przeprowadza się w stężonym kwasie siarkowym (VI) w obecności CuSO₄ jako katalizatora. Aby podwyższyć temperaturę wrzenia mieszaniny dodaje się siarczan potasu lub sodu. W trakcie mineralizacji

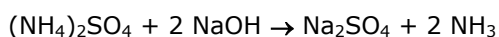
powstają substancje lotne CO₂, H₂O, SO₂ oraz amoniak (NH₃), który natychmiast reaguje z H₂SO₄ tworząc siarczan amonu (NH₄)₂SO₄.



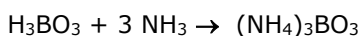
2. Destylacja

Destylację wykonuje się w aparacie Parnasa-Wagnera. Aparat składa się z dużej kolby służącej do wytwarzania pary, części pośredniej, kolby destylacyjnej z lejkiem, chłodnicy i odbieralnika.

Pod działaniem stężonego NaOH siarczan amonu uwalnia amoniak.

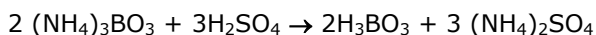


Uwolniony amoniak z parą wodną przechodzi do odbieralnika zawierającego kwas borowy (III) z dodatkiem wskaźnika Tashiro (alkoholowy roztwór czerwieni metylowej i błękitu metylenowego). W kwaśnym środowisku wskaźnik ten zabarwia roztwór na kolor fioletowy. Oddestylowany amoniak wiąże się z kwasem borowym, tworząc boran amonu, co powoduje wzrost pH i zmianę barwy roztworu na zieloną.



3. Miareczkowanie

Po całkowitym oddestylowaniu amoniaku roztwór boranu amonu miareczkuje się mianowanym roztworem H₂SO₄ lub HCl. Mocny kwas (H₂SO₄ lub HCl) wypiera słaby kwas borowy z jego soli.



Uwolniony kwas borowy ponownie zakwasza roztwór zawarty w odbieralniku. Wskaźnik Tashiro przyjmuje na powrót zabarwienie fioletowe.

Z liczby mililitrów H₂SO₄, zużytego do miareczkowania, obliczamy ilość amoniaku związanego z kwasem borowym. Ilość wydzielonego amoniaku odpowiada ilości azotu zawartego w substancji poddanej mineralizacji.

Powyższa metoda ma zastosowanie do oznaczania całkowitej zawartości azotu (azotu białkowego i pozabiałkowego) w surowicy krwi. Ilość azotu pozabiałkowego oznacza się w surowicy po wytrąceniu białek (np. kwasem trichlorooctowym). Zawartość azotu białkowego można obliczyć z różnicy pomiędzy całkowitą zawartością azotu a ilością azotu pozabiałkowego.

Warunkiem uzyskania rzetelnych wyników jest używanie szkła laboratoryjnego i odczynników wolnych od zanieczyszczeń amoniakiem.

W y k o n a n i e

1. Mineralizacja

Mineralizację należy przeprowadzać w kolbkach Kjeldahla pod wyciągiem.

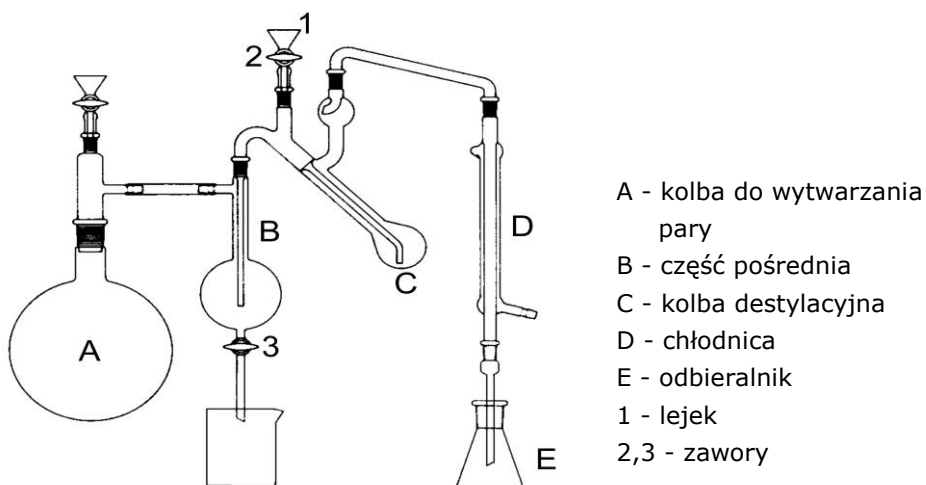
Do kolbki Kjeldahla dodać 0,2 ml surowicy krwi, 0,2 ml 40% CuSO_4 , 1 ml stężonego H_2SO_4 i około 1 g K_2SO_4 . Mieszanina przyjmie barwę brunatną. Ścianki kolbki Kjeldahla spłukać niewielką ilością wody. Kolbkę ustawić skośnie (pod kątem 45°) i ogrzewać nad palnikiem gazowym, najpierw powoli w celu odparowania większości wody, potem stopniowo zwiększać płomień (dodanie kulek szklanych umożliwia samoczynne mieszanie płynu w czasie ogrzewania i zapobiega jego wypryskiwaniu na zewnątrz). Kolbkę wypełniają drażniące dymy. Należy wówczas nakryć wylot kolbki luźnymi, szklanymi korkami (szyjka kolbki spełnia rolę chłodnicy zwrotnej). Ulatniająca się para wodna skrapla się w szyjce, a powstała woda powraca do ogrzewanego płynu, zapobiegając nadmiernemu zagęszczeniu mieszaniny. W trakcie mineralizacji zanika barwa brunatna. Roztwór rozjaśnia się i przyjmuje zabarwienie niebieskie, pochodzące od CuSO_4 . Po zupełnym rozjaśnieniu płynu kontynuować mineralizację przez godzinę. Po zakończeniu ochłodzić kolbkę do temperatury pokojowej i dodać 3 ml H_2O . Zawartość kolbki poddać destylacji w aparacie Parnasa - Wagnera (Ryc. 1).

2. Destylacja

Przygotować odbieralnik (**E**) – do wysokiej zlewki o pojemności 100 ml odmierzyć dokładnie 10 ml 4% H_3BO_3 i kilka kropeł wskaźnika Tashiro.

Odbieralnik podstawić pod chłodnicę tak, by jej koniec był zanurzony w płynie. Zmineralizowaną substancję z kolby Kjeldahla (10 ml) przenieść przez lejek (**1**) do kolby destylacyjnej (**C**) i dodać kilka kropeł czerwieni metylowej. Zalkalizować zawartość kolby destylacyjnej wlewając przez lejek (**1**) 1 ml 20% roztworu NaOH, do zmiany barwy płynu z czerwonej na żółtą. Lejek przepłukać trzykrotnie kilkoma ml wody destylowanej. Ogrzać do wrzenia wodę w kolbie **A**. Zamknąć zawory **2** i **3**.

Kontynuować destylację przez 30 sekund od zmiany zabarwienia (z fioletowej na zieloną) roztworu w odbieralniku. Następnie odstawić odbieralnik i przerwać ogrzewanie. Zawartość kolby destylacyjnej, wskutek różnicy ciśnień, zostaje przezucona do kolby pośredniej (**B**). Usunąć płyn z kolby pośredniej przez otwarcie zacisków **2** i **3**. Przepłukać kolbę destylacyjną kilkakrotnie wodą destylowaną.



Ryc. 1 Schemat aparatu Parnasa – Wagnera

3. Miareczkowanie

Zawartość odbieralnika miareczkować 0,005M H₂SO₄ do wystąpienia fioletowego zabarwienia. Obliczyć zawartość azotu.

Jeden milimol H₂SO₄ wiąże 2 milimole NH₃ (2 x 17 = 34 mg), co odpowiada 28 mg azotu. Jeden mililitr 0,005M H₂SO₄ zawiera 0,005 milimola tego kwasu, który wiąże 0,01 milimola amoniaku, co odpowiada 0,14 mg azotu. Mnożąc objętość kwasu zużytego do miareczkowania przez 0,14 otrzymujemy liczbę mg azotu w badanej próbce.

$$x = V \times 0,14$$

x - zawartość azotu w badanej próbce (mg)

V - objętość zużytego kwasu (ml)

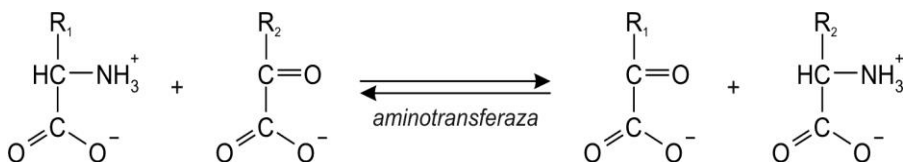
0,14 - współczynnik przeliczeniowy

II. Transaminacja

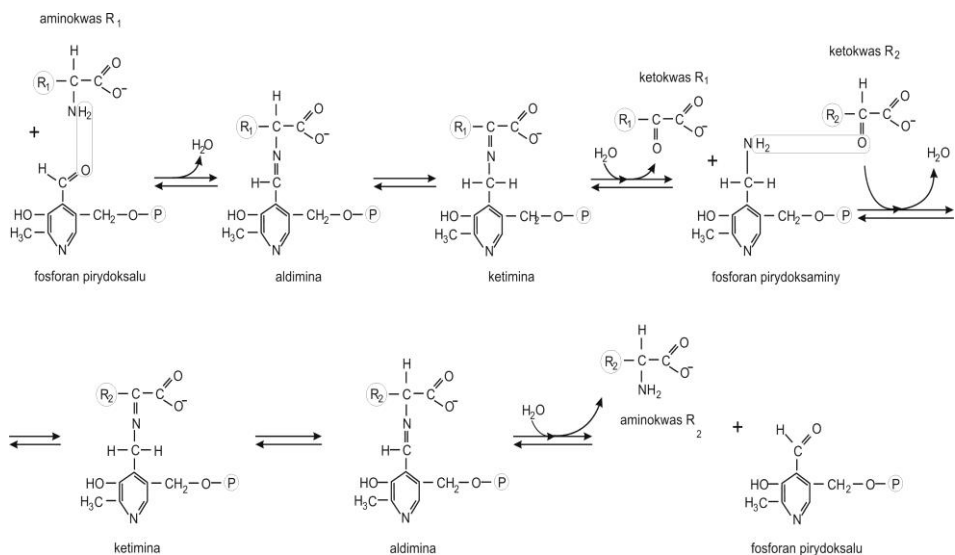
Pierwszym etapem rozkładu aminokwasów jest na ogół **transaminacja**, polegająca na przenoszeniu grup aminowych z różnych aminokwasów na jeden z trzech α-ketokwasów: pirogronian, szczawiooctan lub α-ketoglutaran. Donorami grup aminowych w reakcjach transaminacji są niemal wszystkie aminokwasy, z wyjątkiem lizyny i treoniny oraz proliny i hydroksyproliny. Aminokwas pozbawiony grupy aminowej staje się ketokwasem, a ketokwas, który przyłączył grupę aminową, staje się aminokwasem. Wskutek transaminacji powstaje zatem nowy aminokwas i nowy ketokwas.

Reakcje transaminacji katalizują **aminotransferazy**, których koenzymami są fosforan pirydoksalu/fosforan pirydoksaminy. Fosforan pirydoksalu z aminokwasami tworzy kompleks typu zasady Schiffa.

Przebieg transaminacji ilustruje poniższe równanie.



Udział fosforanu pirydoksalu w procesie transaminacji przedstawia poniższy schemat:



Celem doświadczenia jest wykazanie aktywności *aminotransferazy glutaminianowej* w mięśniu sercowym. Należy inkubować roztwór asparginianu i α -ketoglutaranu z ekstraktem z bydlęcego mięśnia sercowego. W wyniku działania *aminotransferazy*, obecnej w mięśniu sercowym, α -ketoglutaran zostanie przekształcony w glutaminian z jednoczesną przemianą asparginianu do szczawiooctanu. Wynik transaminacji należy analizować przy pomocy chromatografii bibułowej.

Chromatografia bibułowa jest jedną z form chromatografii cieczowej, w której **fazę stałą** (rozdzielczą) stanowi arkusz celulozy o nazwie bibuła *Whatmana*. Substancje rozdzielane nanosi się punktowo, w odległości około 3 cm od dolnej krawędzi arkusza (linia startowa), po czym bibułę umieszcza się w komorze chromatograficznej, zanurzając ją na kilka milimetrów w mieszaninie rozpuszczalników, zwanej eluentem (**faza ruchoma**), tak by naniesione substancje znalazły się nad powierzchnią eluentu. Dzięki siłom włosowatości eluent wędruje stopniowo ku górze, pociągając za sobą z różną prędkością składniki występujące w analizowanej mieszaninie. Gdy czoło eluentu zbliży się do górnej krawędzi bibuły, rozdział jest zakończony. Poszczególne składniki mieszaniny podążają z różną prędkością za czołem rozpuszczalnika. Dzięki różnicy w prędkościach wędrówki poszczególnych składników mieszaniny, w momencie zakończenia analizy znajdują się one na różnych wysokościach w stosunku do linii startu. Każdemu z nich odpowiada jedna „plamka”. Etap ten nosi nazwę rozwijania chromatogramu.

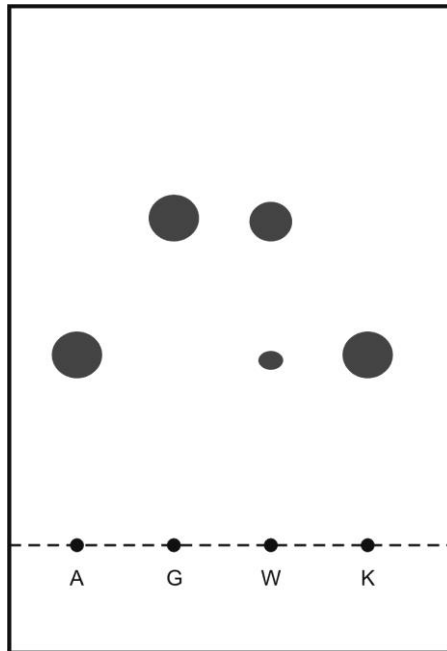
Gdy rozdzielane związki są barwne, plamki te można bezpośrednio obserwować na bibule. W przypadku, gdy składniki są bezbarwne, należy je zabarwić odpowiednimi odczynnikami. W przypadku chromatografii aminokwasów stosuje się roztwór ninhydryny.

Każda substancja zawarta w mieszaninie poddawanej chromatografii bibułowej cechuje się określonym współczynnikiem **Rf** (wskaźnik opóźnienia). Wyraża się go jako stosunek drogi przebytej przez składnik mieszaniny (S_1) do drogi przebytej przez czoło eluentu (S_2).

$$Rf = \frac{S_1}{S_2}$$

S_1 - droga przebyta przez składnik mieszaniny

S_2 - droga przebyta przez czoło eluentu



Rozwinięty chromatogram przedstawia wynik procesu transaminacji

- A** – standard asparagianu
- G** – standard glutaminianu
- W** – próba właściwa
- K** – próba kontrolna

Wykonanie

Do 2 probówek odmierzyć po:

- 0,2 ml 0,5M buforu fosforanowego o pH 8,3
- 0,1 ml 0,2M roztworu asparagianu
- 0,1 ml 0,2M roztworu α -ketoglutaranu
- 1,5 ml zawiesiny mięśnia sercowego

Zawartość jednej probówki zmieszać i natychmiast umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 10 minut w celu inaktywacji enzymu (próba

kontrolna). Drugą probówkę, po zmieszaniu zawartości, inkubować w temperaturze 37°C przez 2 godziny (próba właściwa). Po zakończeniu inkubacji obie mieszaniny przesączyć do oddzielnych probówek i wykonać rozdział chromatograficzny.

Wyciąć z bibuły *Whatman 1* prostokąt o wymiarach 12 x 24 cm. W odległości 3 cm od dolnego brzegu narysować ołówkiem linię startową i zaznaczyć cztery, równo od siebie oddalone, punkty (**A**, **G**, **W**, **K**). Na tak zaznaczone punkty nanieść mikropipetą po 3 krople odpowiednich roztworów (jednorazowo nanosić po 1 kropli, za każdym razem susząc bibułę):

- na punkt **A** - 0,2M roztwór asparagianu
- na punkt **G** - 0,2M roztwór glutaminianu
- na punkt **W** - przesącz próby właściwej
- na punkt **K** - przesącz próby kontrolnej

Bibułę zawiesić w komorze amoniakalnej na kilka minut w celu neutralizacji kwaśnych soli i wolnych aminokwasów. Następnie przenieść ją do komory chromatograficznej, zawierającej mieszaninę rozpuszczalników – butanol:woda (4:1). Chromatografię należy kontynuować do momentu, aż czoło eluentu znajdzie się na wysokości około 15 cm od linii startowej. Trwa to około 3-4 godzin. Następnie wyjąć chromatogram, wysuszyć (najpierw w temperaturze pokojowej, potem w temperaturze 90°C), spryskać roztworem ninhydryny i ponownie wysuszyć strumieniem gorącego powietrza.

Obliczyć i porównać współczynniki **R_f** dla poszczególnych plamek. Zwrócić uwagę na pojawienie się na chromatogramie plamki o wartości **R_f**, odpowiadającej glutaminianowi.

Obliczenia biochemiczne

1. Obliczyć długość łańcucha polipeptydowego, zawierającego 120 reszt aminokwasowych, jeżeli: [a] występuje on w formie α -helisy, [b] jest on w pełni rozciągnięty.
2. Jaka jest łączna długość wszystkich łańcuchów polipeptydowych w komórce bakteryjnej, jeśli zawiera ona 10^6 cząsteczek białkowych, a każda z tych cząsteczek ma masę cząsteczkową 40 kDa i występuje w formie: [a] α -helisy, [b] w pełni rozciągniętej?
(średnia masa cząsteczkowa jednej reszty aminokwasowej wynosi około 100 Da).
3. Komórki ssaków zawierają DNA w ilości odpowiadającej $3,9 \times 10^9$ par nukleotydów. Jaka jest sumaryczna długość cząsteczek DNA, zawartych w jednej komórce?
4. Obliczyć (w katalach i jednostkach międzynarodowych) aktywność dehydrogenazy mleczanowej, która w temperaturze 30°C , w warunkach optymalnych dla działania tego enzymu przekształciła 60 milimoli mleczanu w pirogronian, w czasie 5 minut.
5. Obliczyć (w katalach i w jednostkach międzynarodowych) aktywność ureazy, która przekształciła pewną ilość mocznika w produkty gazowe o łącznej objętości 134,4 ml (mierzonej w warunkach normalnych) w czasie 1 minuty.
6. Ile milimoli NAD^+ potrzeba do przekształcenia 3,6 g glukozy do acetylo~S-CoA?
7. Ile milimoli NAD^+ potrzeba do przekształcenia 0,18 g glukozy do CO_2 i H_2O ?
8. Ile ml CO_2 powstanie w wyniku przekształcenia 90 mg glukozy w acetylo~S-CoA?
9. Ile moli ATP powstanie w wyniku przekształcenia 0,2 mola fruktozo-1,6-bis-fosforanu do fosfoenolpirogronianu?

10. Ile moli ATP powstanie w wyniku utlenienia 0,9 g mleczanu do acetylo~S-CoA?
11. Ile moli ATP powstanie w wyniku przekształcenia 0,5 mola fosfoenolopirogronianu w acetylo~S-CoA?
12. Ile moli ATP powstanie w wyniku przemiany 8,8 g pirogronianu do CO₂ i H₂O?
13. Ile moli ATP powstanie w wyniku utlenienia 45 mg glukozy do CO₂ i H₂O?
14. Ile moli NADH+H⁺ powstanie w wyniku przemiany 3,6 g mleczanu do CO₂ i H₂O?
15. Ile mg glukozy uległo utlenieniu do CO₂ i H₂O, jeżeli równocześnie powstało 19 milimoli ATP?
16. Ile mikromoli ATP powstanie na drodze fosforylacji substratowej w trakcie przemiany 5 mikromoli fosfoenolopirogronianu do CO₂ i H₂O?
17. Ile mikromoli ATP powstanie na drodze fosforylacji oksydacyjnej w trakcie przekształcania 4 mikromoli izocytrynianu w jabłczan?
18. Ile milimoli ATP powstanie na drodze fosforylacji substratowej w wyniku przemiany 0,9 g glukozy do CO₂ i H₂O?
19. Ile mikromoli ATP powstanie na drodze fosforylacji oksydacyjnej w trakcie przemiany 5 mikromoli fosfodihydroksyacetonu do acetylo~S-CoA?
20. Ile moli ATP powstanie w wyniku całkowitego utlenienia (do CO₂ i H₂O) następujących substratów:
 - 0,2 mola acetylo~S-CoA,
 - 0,1 mola fosfoenolopirogronianu,
 - 0,3 mola aldehydu 3-fosfoglicerynowego,
 - 0,2 mola 3-fosfoglicerynianu?

21. Ile ml CO_2 uwolni się w wyniku oksydacyjnej dekarboksylacji 4,4 mg pirogronianu?
22. Ile moli ATP potrzeba do przemiany 4,4 milimola pirogronianu w szczawiooctan w przebiegu glukoneogenezy?
23. W jaki sposób mleczan może być wykorzystany jako substrat w procesie glukoneogenezy? Obliczyć bilans energetyczny przemiany 4,5 g mleczanu do szczawiooctanu.
24. Ile milimoli $\text{NADPH}+\text{H}^+$ powstanie w wyniku przekształcenia 1,8 g glukozy w rybulozo-5-fosforan?
25. Ile milimoli $\text{NADPH}+\text{H}^+$ potrzeba do biosyntezy 5 mikromoli kwasu arachidowego (20 C) z aktywnego octanu?
26. Ile moli ATP powstanie w wyniku β -oksydacji 0,3 mola laurynylo~S-CoA (12 C)?
27. Ile moli ATP powstanie w wyniku całkowitego utlenienia (do CO_2 i H_2O) 0,4 mola mirystylo~S-CoA (14C)?
28. Ile moli ATP powstanie w wyniku całkowitego utlenienia (do CO_2 i H_2O) 2 moli kwasu arachidowego (20 C)?
29. Ile moli ATP powstanie w wyniku całkowitego utlenienia (do CO_2 i H_2O) 3 moli glicerolo-3-fosforanu?
30. Oblicz ile moli ATP powstanie w wyniku utlenienia do acetylo-CoA 1 mola aldehydu 3-fosfoglicerynowego i 1 mola aktywnego kwasu mirystynowego (14C) - przedstaw bilans energetyczny.
31. Oblicz ile moli ATP powstanie w wyniku całkowitego utlenienia 1 mola fosfoenolpirogronianu i 1 mola aktywnego kwasu palmitynowego (16C) - przedstaw bilans energetyczny.
32. Ile milimoli $\text{NADPH}+\text{H}^+$ potrzeba do powstania 0,04 mola kwasu laurynowego (12 C) z acetylo~S-CoA?

33. Czy ilość $\text{NADPH}+\text{H}^+$, powstałego w wyniku przemiany 4.5 g glukozy w cyklu pentozowym, wystarczy do biosyntezy 0,2 mola kwasu laurynowego (12C)?
34. Oblicz ile moli ATP powstanie w wyniku utlenienia do acetylo-CoA 1 mola fosfoenolopirogronianu i 1 mola kwasu stearynowego (18C) - przedstaw bilans energetyczny.
35. Oblicz ile moli ATP powstanie w wyniku całkowitego utlenienia 1 mola glukozy-6-fosforanu i 1 mola kwasu stearynowego (18C) - przedstaw bilans energetyczny.
36. Oblicz ile moli ATP powstanie w wyniku utlenienia do acetylo-CoA 1 mola aldehydu 3-fosfoglicerynowego i 1 mola aktywnego kwasu mirystynowego (14C) - przedstaw bilans energetyczny
37. Czy ilość ATP, powstałego w wyniku przemiany 45 mg fruktozy do acetylo~S-CoA, wystarczy do syntezy 30 mg mocznika?
38. Ile ml produktów gazowych powstanie w wyniku rozkładu (przez ureazę) mocznika, powstałego z udziałem 20 mmoli asparagianu?
39. Ile moli mocznika powstanie w wyniku całkowitego rozkładu 8 g białka (zawierającego 16% azotu)?
40. Ile mg glukozy musi utlenić się do CO_2 i H_2O , aby dostarczyć energii potrzebnej do syntezy 15 mg mocznika?
41. Ile mikromoli ATP potrzeba do resyntezy 20 mikromoli glutationu w przebiegu cyklu Meistersa (transport aminokwasów)?