

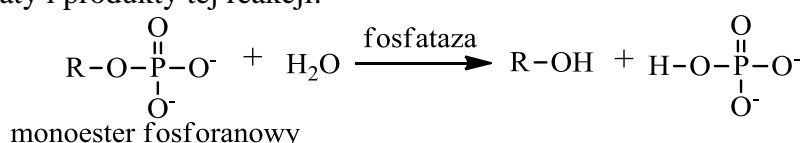
## 4. Oznaczanie zawartości kwaśnej fosfatazy w homogenacie z ziemiaka

Fosfataza kwaśna (EC 3.1.3.2) jest „enzymem znacznikowym” (markerem) lizosomów. Fosfatazy należą do klasy hydrolaz (klasa 3 obejmująca enzymy katalizujące hydrolytyczny rozpad wiązań chemicznych), podklasy esteraz (obejmującą enzymy hydrolizujące wiązania estrowe), podpodklasy hydrolaz monoestrów fosforanowych.

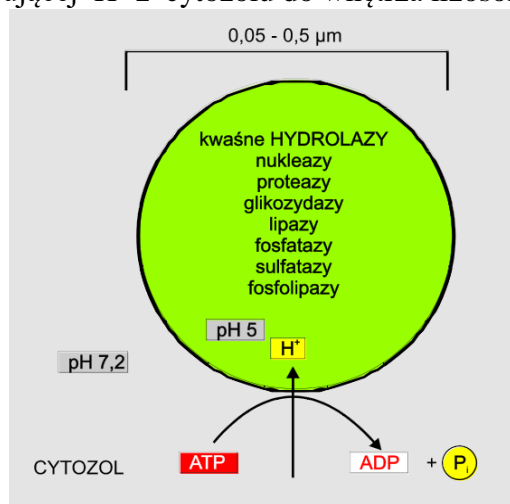
Tabela 1. Klasy enzymów

Klasa	Nazwa	Charakterystyka
EC 1	oksydoreduktazy	katalizują odwracalne reakcje utleniania i redukcji, a więc przemiany związane z przeniesieniem protonów i elektronów; ważne podklasy: oksydazy, peroksydazy, reduktazy, monooksygenazy, dioksygenazy
EC 2	transferazy	katalizują przenoszenie grup funkcyjnych z cząsteczki jednej substancji (donor) na cząsteczkę drugiej substancji (akceptor); ważne podklasy: C <sub>1</sub> -transferazy (przenoszące grupy jednowęglowe), acylotransferazy, aminotransferazy, fosfotransferazy (kinazy), glikozylotransferazy
EC 3	hydrolazy	katalizują rozpad substratu pod wpływem wody - na drodze hydrolyzy; ważne podklasy: esterazy, glikozydazy, peptydazy, lipazy, nukleazy
EC 4	liazy	katalizują odszczepienie od substratów określonej grupy chemicznej (niehydrolytycznie) z wytworzeniem podwójnego wiązania lub odwrotnie, przyłączają grupy do wiązania podwójnego; ważne podklasy: liazy C-C, liazy C-O, liazy C-N, liazy C-S
EC 5	izomerazy	zmieniają wzajemne położenie grup chemicznych bez rozkładu szkieletu związku; powodują wewnątrzcząsteczkową izomeryzację; ważne podklasy: epimerazy, izomerazy cis trans, transferazy wewnątrzcząsteczkowe
EC 6	ligazy (syntetazy)	powodują łączenie dwóch substratów kosztem energii z ATP; uczestniczą w tworzeniu nowych wiązań chemicznych; ważne podklasy: syntetazy C-C syntetazy C-O syntetazy C-N syntetazy C-S

Fosfatazy katalizują odszczepienie reszty fosforanowej od cukrów, białek, tłuszczu, nukleotydów i wielu innych występujących w przyrodzie estrów kwasu fosforowego. Poniżej schemat przedstawia substraty i produkty tej reakcji:



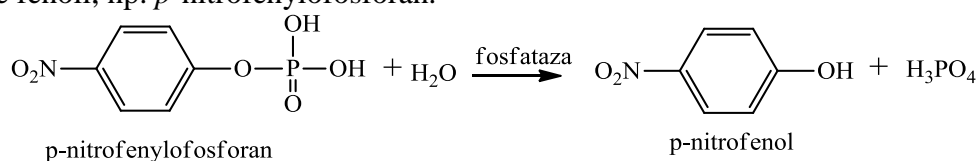
Wyróżnia się fosfatazy działające w środowisku alkalicznym (EC 3.1.3.1), w zakresie pH 9 - 11 oraz fosfatazy działające w środowisku kwaśnym, w zakresie pH 3,8 – 7,0. Te ostatnie są typowe dla komórek roślinnych, chociaż nie brakuje ich także w komórkach zwierzęcych, gdzie występują przede wszystkim w lizosomach - niewielkich błonowych pęcherzykach będących głównym miejscem trawienia wewnątrzkomórkowego. Lizosomy zawierają specyficzny zestaw hydrolaz (Rys. 1), aktywnych w środowisku kwaśnym, uczestniczących w rozkładzie organelli komórkowych i wszystkich rodzajów makrocząsteczek dostarczanych do komórki różnymi drogami. Wiodącym enzymem jest tu kwaśna fosfataza uznawana za tzw. „enzym znacznikowy” lizosomów. Kwaśne środowisko wnętrza lizosomu (pH~5) utrzymywane jest dzięki działaniu błonowej H<sup>+</sup>-ATPazy, pompującej H<sup>+</sup> z cytozolu do wnętrza lizosomu.



Rys. 1. Schemat lizosomu (wg Albertsa i wsp. 1999)

W obojętnym pH cytoplazmy (pH 7–7,3), hydrolityczne enzymy lizosomalne wykazują niską aktywność. Stanowi to przypuszczalnie mechanizm obronny przed samoistnym strawieniem komórki, w przypadku gdyby enzymy dostały się do cytoplazmy. W komórkach roślin i grzybów rolę lizosomów pełni wakuola komórkowa. Kwaśny odczyn wnętrza wakuoli, istotny dla aktywności występujących tam enzymów hydrolitycznych, utrzymywany jest dzięki działaniu dwóch pomp protonowych (H<sup>+</sup>-ATPazy i H<sup>+</sup>-PPazy) zlokalizowanych w błonie otaczającej wakuolę, tzw. tonoplście.

Poza naturalnymi substratami, hydrolazy monoestrów fosforanowych rozszczepiają także estry fosforanowe fenoli, np. *p*-nitrofenylofosforan.



Odczynniki i sprzęt:

1. 50 g Ziemiaków
2. Tarka do ziemniaków
3. Próbówki szklane
4. Statywy do próbówek
5. Pipety automatyczne
6. Łażnia wodna
7. Spektrofotometr UV-VIS
8. 12 mL 0,005 M roztworu soli dwusodowej kwasu nitrofenylofosforanowego (M=371,14 g/mol) **(przygotować bezpośrednio przed użyciem)**
9. 5 mL 0,1 M Buforu cytrynianowego o pH 5,2
10. 15 mL 1 N roztworu NaOH
11. 10 mL 0,005 M Roztworu *p*-nitrofenolu w wodzie (M=139 g/mol)

Wykonanie doświadczenia:

**A. Izolacja ekstraktu enzymatycznego**

Okolo 50 g obranego i umytego ziemniaka zetrzeć na tarce i przesączyć przez gazę. Zmierzyć objętość wyciągu z ziemniaka (mL) i odstawić do lodówki.

**B. Oznaczanie aktywności enzymatyczne fosfatazy**

Do pięciu ponumerowanych probówek laboratoryjnych odpipetować roztwory według następującego schematu:

nr probówki	homogenat z ziemniaka [mL]	woda destylowana [mL]	Bufor cytrynianowy [mL]
1. kontrola	0	2,0	1,0
2.	0,5	1,5	1,0
3.	1,0	1,0	1,0
4.	1,5	0,5	1,0
5.	2,0	0	1,0

Probówki, po dokładnym wymieszaniu, wstawić do łaźni wodnej (lub suszarki laboratoryjnej) o temperaturze 37°C na 15 minut. Następnie do każdej próbówki odpipetować szybko po 2 mL 0,005 M roztworu nitrofenylofosforanu sodu o temperaturze 37°C i poddać inkubacji w temperaturze 37°C przez okres podany przez prowadzącego ćwiczenia (od 30-40 minut). Dokładnie po tym czasie do każdej próbówki dodać po 1 mL 1 N roztworu NaOH i całość wymieszać. Następnie dla każdej próbówki wykonać 8-krotne rozcieńczenie w wodzie i przeprowadzić pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda = 410$  nm.

**C. Wykonanie krzywej standardowej dla p-nitrofenolu**

Równolegle przygotować w probówkach roztwory o następującym składzie:

1	1 mL roztworu p-nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3 mL wody destylowanej
2	0,75 mL roztworu p-nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,25 mL wody destylowanej
3	0,5 mL roztworu p-nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,5 mL wody destylowanej
4	0,25 mL roztworu p-nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,75 mL wody destylowanej
5	0,1 mL roztworu p-nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,9 mL wody destylowanej
6	0,05 mL roztworu p-nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,95 mL wody destylowanej
7	0,025 mL roztworu p-nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,975 mL wody destylowanej

Dla każdej próbówki wykonać 8-krotne rozcieńczenie w wodzie, zmierzyć wartości absorbancji (przy  $\lambda = 410$  nm) i sporządzić krzywą wzorcową dla p-nitrofenolu - na osi rzędnych umieścić wartości absorbancji, a na osi odciętych ilości ( $\mu$ mole) p-nitrofenolu.

Obliczyć ilość enzymu katalizującą przemianę 1  $\mu$ mola substratu w czasie 1 minuty – jest to jednostka enzymatyczna U. Otrzymany wynik podać również w jednostce katal.