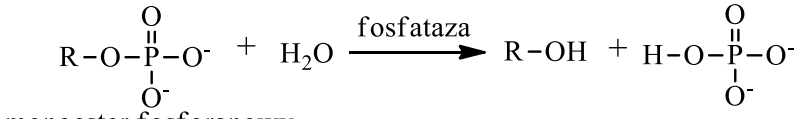
4. Identyfikacja kwaśnej fosfatazy w homogenacie z ziemniaka

Fosfataza kwaśna (EC 3.1.3.2) jest „**enzymem znacznikowym**" (markerem) lizosomów. Fosfatazy należą do klasy hydrolaz (klasa 3 obejmująca enzymy katalizujące hydrolityczny 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: C1-transferazy (przenoszące grupy jednowęglowe), acylotransferazy, aminotransferazy, fosfotransferazy (kinazy), glikozylotransferazy
EC 3	hydrolazy	katalizują rozpad substratu pod wpływem wody - na drodze hydrolizy; ważne podklasy: esterazy, glikozydazy, peptydazy, lipazy, nukleazy
EC 4	liazy	rozcinają wiązania (m.in. C-C, C-O, C-N) na innej drodze niż hydroliza i utlenianie. Katalizują reakcje, w których udział biorą dwa substraty (w jednym kierunku) oraz jeden (w przeciwnym). Działając na jeden substrat powodują jego rozpad na dwa produkty, czemu towarzyszy powstanie nowego wiązania podwójnego lub utworzenie układu cyklicznego. 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

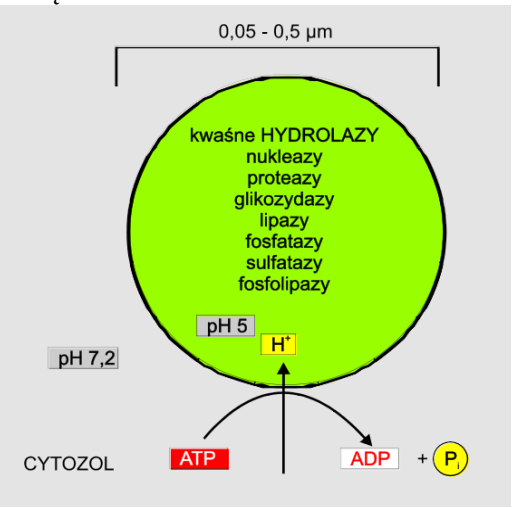
Fosfatazy katalizują odszczepienie reszty fosforanowej od cukrów, białek, tłuszczy, nukleotydów i wielu innych występujących w przyrodzie estrów kwasu fosforowego. Poniży schemat przedstawia substraty i produkty tej reakcji:



monoester fosforanowy

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

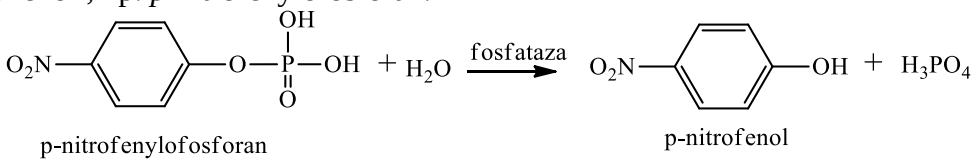
(Rys. 1), aktywnych w środowisku kwaśnym, uczestniczących w rozkładzie organelli komórkowych i wszystkich rodzajów makrocząsteczek dostarczanych do komórki różnymi drogami. Wiodącym enzymem jest tu kwaśna fosfataza uznawana za tzw. **„enzym znacznikowy”** lizosomów. Kwaśne środowisko wnętrza lizosomu (pH~5) utrzymywane jest dzięki działaniu błonowej H^+-ATPazy, pompującej H^+ 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^+-ATPazy i H^+-PPazy) zlokalizowanych w błonie otaczającej wakuolę, tzw. tonoplaście.

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



Odczynniki i sprzęt:

1. Ziemniak
2. Tarka do ziemniaków
3. Próbówki szklane
4. Statywy do próbówek
5. Pipety automatyczne
6. Łaźnia 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, przechowywać w temp. 37°C**)
9. 5 mL 0,1 M buforu cytrynianowego o pH 5,2
10. 15 mL 1 M roztworu NaOH
11. 10 mL 0,005 M roztworu *p*-nitrofenolu w wodzie (M=139 g/mol)

Wykonanie doświadczenia:

A. Izolacja ekstraktu enzymatycznego

Obrany i umyty ziemniak zetrzeć na tarce, przesączyć przez gazę i odstawić do lodówki na około 15 min. Po tym czasie, odwirować wytrącony osad, a supernatant rozcieńczyć czterokrotnie wodą destylowaną.

B. Oznaczanie aktywności enzymatyczne fosfatazy

Do pięciu ponumerowanych probówek laboratoryjnych odpipetować roztwory według następującego schematu:

nr probówki	homogenat z ziemniaka [mL]	woda [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 rozpipetować szybko po 2 mL 0,005 M roztworu nitrofenylofosforanu sodu i poddać inkubacji w temperaturze 37°C przez okres podany przez prowadzącego ćwiczenia (od 30 do 40 minut). Dokładnie po tym czasie, do każdej próbówki dodać po 1 mL 1 M roztworu NaOH i całość wymieszać. Następnie dla każdej probówki wykonać 16-krotne rozcieńczenie, bezpośrednio w kuwecie pomiarowej, 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 :

Nr probówki	*p*- nitrofenol [mL]	*p*- nitrofenol [µmol]	Stężenie *p*- nitrofenolu [mM]	Stężenie *p*- nitrofenolu po rozcieńczeniu [mM]	*p*-nitrofenol po rozcieńczeniu [µmol]	1 M NaOH [mL]	woda [mL]
1	1					1	3
2	0,75					1	3,25
3	0,5					1	3,5
4	0,25					1	3,75
5	0,1					1	3,9
6	0,05					1	3,95
7	0,025					1	3,975

Dla każdej probówki wykonać, bezpośrednio w kuwecie pomiarowej, 16-krotne rozcieńczenie w wodzie, zmierzyć wartości absorbancji (przy $\lambda = 410$ nm) i sporządzić krzywą wzorcową dla *p*-nitrofenolu (wykorzystując dane z powyższej tabelki) - na osi rzędnych (y) umieścić wartości absorbancji, a na osi odciętych (x) ilości (µmole) *p*-nitrofenolu po rozcieńczeniu.

Sporządzić wykres zależności szybkości reakcji (µmol/min.) od objętości homogenatu. Obliczyć ilość homogenatu (uwzględniając wcześniejsze rozcieńczenia) katalizującą przemianę 1 µmola substratu w czasie 1 minuty – jest to jednostka enzymatyczna U. Otrzymany wynik podać również w jednostce katal.