

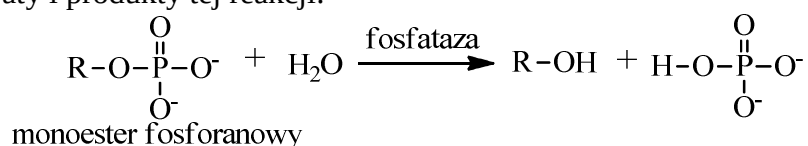
4. Oznaczanie zawartości kwaśnej fosfatazy w homogenacie z ziemniaka

Fosfataza kwaśna (EC 3.1.3.2) jest „**enzymem znacznikowym**” (markerem) lizosomów, głównego miejsca trawienia wewnątrzkomórkowego. 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.

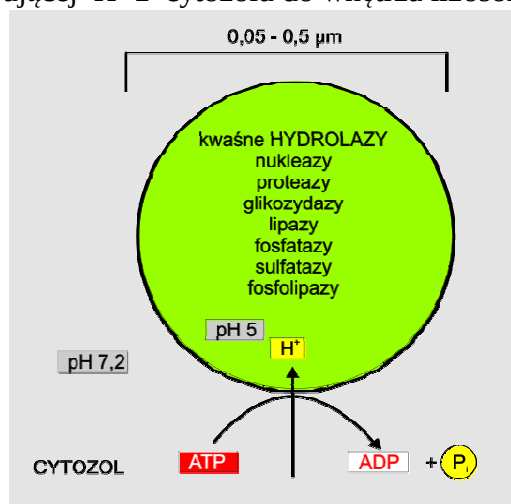
Tabela 1. Klasy enzymów

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 jednowęgłowe), 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	katalizują odszczepienie od substratów określonej grupy chemicznej (niehydrolitycznie) 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, tłuszczów, nukleotydów i wielu innych występujących w przyrodzie estrów kwasu fosforowego. Poniżej schemat przedstawia substraty i produkty tej reakcji:



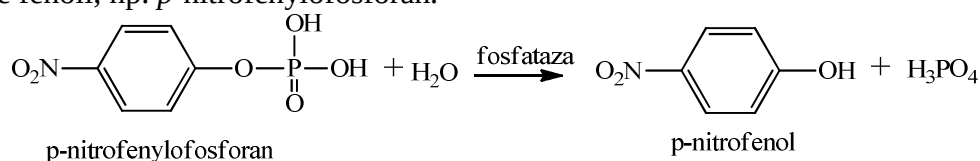
Wyróżnia się fosfatazy działające w środowisku alkalicznym (EC 3.1.3.1), w zakresie pH 9,0 - 11,0 oraz fosfatazy działające w środowisku kwaśnym, w zakresie pH 3,8 - 7,0. Te ostatnie są typowe dla komórek roślinnych, chociaż nie brakuje ich także w komórkach zwierzęcych, gdzie występują przede wszystkim 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. tonoplście.

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



Odczynniki i sprzęt:

1. 50 g Ziemniaków
2. Tarka do ziemniaków
3. Próbówki szklane
4. Statywy do próbówek
5. Pipety automatyczne
6. Łaźnia wodna
7. Spektrofotometr UV-VIS
8. 15 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

Około 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 enzymatycznej

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 dodanych roztworów, wstawić do łaźni wodnej 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 20-40 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 wobec wody destylowanej.

Równolegle przygotować w probówkach roztwory o następującym składzie:

1. 1 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3 mL wody destylowanej
2. 0,75 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,25 mL wody destylowanej
3. 0,65 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,35 mL wody destylowanej
1. 0,5 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,5 mL wody destylowanej
2. 0,4 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,6 mL wody destylowanej
3. 0,25 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,75 mL wody destylowanej
4. 0,1 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,9 mL wody destylowanej
5. 0,05 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,95 mL wody destylowanej
6. 0,025 mL roztworu <i>p</i> -nitrofenolu	+ 1 mL 1N NaOH	+ 3,975 mL wody destylowanej

Dla każdej próbówki wykonać 8-krotne rozcieńczenie w wodzie i zmierzyć wartości absorbancji (przy $\lambda = 410$ nm) roztworów i sporządzić krzywą wzorcową dla *p*-nitrofenolu.

Sporządzić wykres odkładając na osi rzędnych μ mole zhydrolizowanego substratu/min., a na osi odciętych ilość dodanego homogenatu w mL.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć liczbę jednostek enzymatycznych (U) kwaśnej fosfatazy zawartych w 1 g ziemniaka. Jednostka enzymatyczna U to ilość enzymu katalizująca przemianę 1 μ mola substratu w czasie 1 minuty. Otrzymany wynik podać również w jednostce katal.