

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Biblioteka Główna



215000094118

Wisniowski Paris
MAIL
X889

WOJSKOWA AKADEMIA MEDYCZNA
im. gen. dyw. BOLESŁAWA SZARECKIEGO

MARIA KUPTT, IRENA ZAKRZEWSKA, JERZY KLEM
MAREK STRZELCZYK

SKRYPT DO ĆWICZEŃ
Z BIOCHEMII

cz. I

Łódź 1989 r.



SERDECZNIE DZIEKUJEMY:

- mgr P. Wołkaninowi za wykonanie rysunków wzorów chemicznych.
- dr J. Gromadzinskiej, dr Marii Skłodowskiej dr W. Wasowiczowi za cenne uwagi i korekty.
- Starszemu technikowi Barbarze Kaczmarek - za przygotowanie maszynopisu na komputerze.

AUTORZY

WIADOMOSCI WSTEPNE

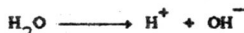
1 WIADOMOSCI WSTEPNE

Woda i produkty jej jonizacji tj. jony wodorowe i wodorotlenowe stanowią ważne czynniki uczestniczące w określaniu cech struktury i biologicznych właściwości białek, kwasów nukleinowych, lipidów, błon i wielu innych składników komórkowych.

1.1 JONIZACJA WODY

Woda dysocjuje na JONY HYDRONIOWE (H_3O^+) i JONY WODOROTLENOWE (OH^-).

Dla uproszczenia będziemy mówili o jonie hydroniowym jako o jonie wodorowym (H^+), a wtedy równanie dysocjacji wody będzie wyglądało następująco:



stała równowagi tej dysocjacji wynosi:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} = 1.8 \times 10^{-16} \quad (1)$$

Ponieważ stężenie wody $[H_2O]$ wynosi $[H_2O] = 1000g/dcm^3 : 18g/mol = 55.5 \text{ mol/dcm}^3$ (2) i zmienia się w bardzo niewielkim stopniu, można więc przyjąć:

$$K [H_2O] = K_w = [H^+] \times [OH^-] \quad (3)$$

Podstawiając wartość (1) i (2) do równania (3) otrzymujemy

$$K_w = [H^+] \times [OH^-] = 55.5 \times 1.8 \times 10^{-16} \text{ stąd } [H^+] \times [OH^-] = 1 \times 10^{-14}$$

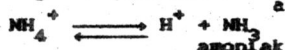
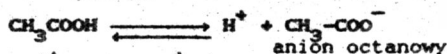
K_w jest iloczynem jonowym wody, w temp. 25° równym 1×10^{-14}

Zauważamy, że stężenie H^+ i OH^- są odwrotnie proporcjonalne. Jeżeli stężenie H^+ jest duże to stężenie OH^- musi być małe i odwrotnie np. jeżeli $[H^+] = 10^{-2} \text{ mol/l}$, to $[OH^-] = 10^{-12} \text{ mol/l}$.

WIADOMOŚCI WSTĘPNE

12. DEFINICJA KWASU I ZASADY

KWAS jest donorem protonu, a ZASADA jego akceptorem



DEFINICJA LEWISA: teoria Lewisa wiąże pojęcia kwasu i zasady z przyłączeniem lub oddawaniem pary elektronowej. Za KWASY (tzn. kwasy Lewisa) uważa się cząsteczki, które są akceptorem pary (lub par) elektronowej. ZASADA Lewisa jest związek będący donorem pary (par) elektronowej.

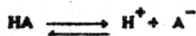
W wyniku jonizacji kwasu powstaje sprzężona z tym kwasem zasada, a przeciwnie protonacja zasady prowadzi do powstania sprzężonego z nią kwasu. Kwas octowy i octan tworzą sprzężoną parę kwas - zasada.

13. DEFINICJA PH I PK

PH jest miara stężenia H^+ w roztworze. PH jest zdefiniowane następująco:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = -\log_{10} [\text{H}^+] \quad (1)$$

Równanie dysocjacji słabego kwasu wygląda następująco:



Pozorna stała dysocjacji tego kwasu wynosi:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (2)$$

Ponieważ często wartości K dla słabych kwasów i słabych zasad są ujemnymi liczbami wykładniczymi, wygodne jest wyrażenie K jako pK:

$$\text{gdzie } \text{pK} = -\log K = \log \frac{1}{K} \quad (3)$$

WIADOMOSCI WSTEPNE

pK kwasu odpowiada takiemu pH, przy którym połowa tego kwasu jest zdysocjowana.

14. RÓWNANIE HENDERSONA - HASSELBACHA

Jaka jest zależność pomiędzy pH a proporcją kwasu do zasady w roztworze?

Potrzebne wyrażenie wyprowadza się z równania (2)

$$\frac{1}{[H^+]} = \frac{1}{K} \times \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (4)$$

Po zlogarytmowaniu obu stron otrzymuje się

$$\log \frac{1}{[H^+]} = \log \frac{1}{K} + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (5)$$

Podstawiając w równaniu (5) pH w miejsce $\log \frac{1}{[H^+]}$ oraz pK zamiast $\log \frac{1}{K}$ otrzymuje się powszechnie znane równanie Hendersona-Hasselbacha

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

15. POJEMNOŚĆ BUFOROWA

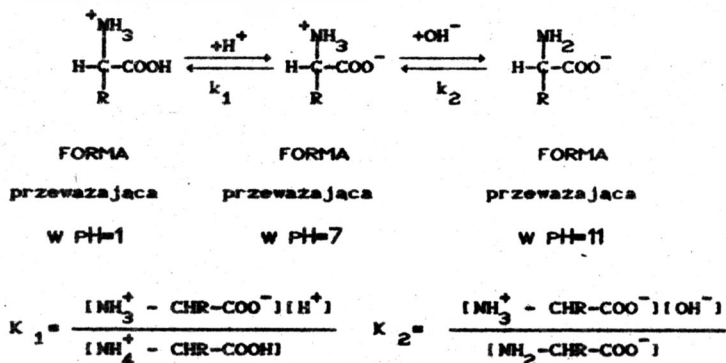
Sprzężona para KWAS-ZASADA (np. kwas octowy i jon octanowy) wykazuje ważną własność opierania się zmianom pH roztworu, czyli innymi słowy działa jak bufor. Dla każdej sprzężonej pary KWAS-ZASADA istnieje charakterystyczna wartość pH, przy której jej zdolność buforowania jest największa i jest to wówczas gdy $pH = pK$. Pojemność buforowa zostaje wyczerpana, gdy znaczna część jonów A^- zostanie wykorzystana do związania jonów H^+ . Buforami o największym znaczeniu biologicznym są pary:



AMINOKWASY

2. AMINOKWASY

AMINOKWASY są podstawowymi jednostkami strukturalnymi białek. Jak sama nazwa wskazuje, aminokwasy zawierają dwie charakterystyczne grupy funkcyjne: **GRUPĘ AMINOWĄ** $-NH_2$ i **GRUPĘ KARBOKSYLOWĄ** $-COOH$. W aminokwasach stanowiących składniki białek grupa aminowa znajduje się w pozycji α w stosunku do grupy karboksylowej. W roztworze o pH obojętnym aminokwasy występują zasadniczo w formie zjonizowanej, jako **JONY OBOJNACZE** (jony dwubiegunowe, zwitter-jony). Aminokwas w postaci jonu obojnego ma protonowaną grupę aminową ($-NH_3^+$) oraz zjonizowaną grupę karboksylową ($-COO^-$). Ze zmianami pH roztworu zmienia się stan ionizacji cząsteczki aminokwasu. W roztworze **KWASNYM** (np. w pH=1) cofa się dysocjacja grupy **KARBOKSYLOWEJ** - staje się ona niezjonizowana ($-COOH$), a zjonizowana pozostaje grupa **AMINOWA** ($-NH_3^+$). W roztworze **ZASADOWYM** (np. pH=11) zjonizowana jest grupa **KARBOKSYLOWA** ($-COO^-$), a niezjonizowana grupa **AMINOWA** ($-NH_2$).



Dysocjacja grupy karboksylowej (kwasowej) i aminowej (zasadowej) aminokwasu jest określona, podobnie jak dysocjacja słabych kwasów i zasad, przez prawo działania mas; każdej grupie odpowiada stała dysocjacji K , której ujemny logarytm nosi nazwę wartości pK . Wartość pK grupy kwasowej wynosi zwykle ok. 2,2. Dla grupy aminowej, która zgodnie z równaniem $\text{R}-\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{R}-\text{NH}_2 + \text{H}^+$ można traktować jako kwas,

AMINOKWASY

zmierzone wartości pK wynoszą 9.0 - 9.8.

TABELA Wartości pK grup funkcyjnych aminokwasów.

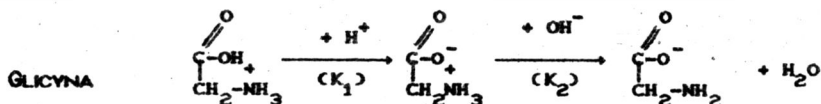
GRUPA	WARTOŚĆ pK	GRUPA	WARTOŚĆ pK
α -COOH	1,7 - 2,6	-SH (Cys)	8,3
α -NH ₃ ⁺	8,9 - 10,9	-OH (Tyr)	10,1
β -COOH (Asp)	3,9	ϵ -NH ₃ ⁺ (Lys)	10,5
γ -COOH (Glu)	4,3	GUANIDYNOWA (Arg)	12,5
		IMIDAZOLOWA (His)	6,0

W wielu przypadkach praktyczne jest opisywanie dysocjacji za pomocą tzw. krzywej miareczkowania. Przedstawia ona osiągniętą wartość pH jako funkcję wprowadzonej ilości kwasu (jonu H⁺) lub zasady; dodając w obu przypadkach 0.5 mola osiąga się wartość pK.

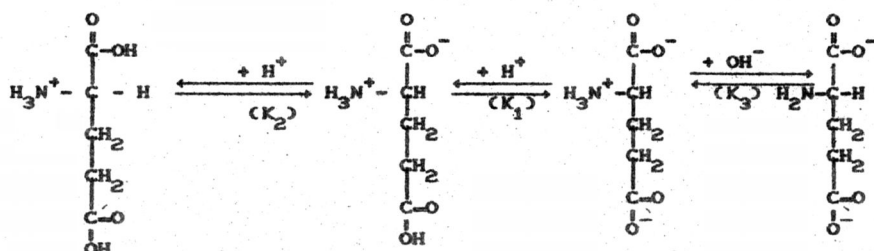
2.1. PUNKT IZOELEKTRYCZNY

PRZY pewnej charakterystycznej dla każdego aminokwasu wartości pH przeważy dwubiegunowa postać aminokwasu. Tę wartość pH nazywamy PUNKTEM IZOELEKTRYCZNYM (pI, pH₁). Przy tej wartości pH aminokwas jest zewnętrźnie elektroobojętny, chociaż każda cząsteczka zawiera ładunek dodatni i ładunek ujemny. Punkt izoelektryczny stanowi średnia arytmetyczna pK grupy kwasowej i zasadowej - dla aminokwasów obojętnych i kwasnych.

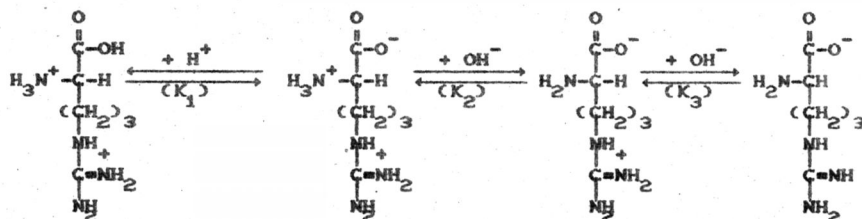
$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$



AMINOKWASY



KWAS GLUTAMINOWY



ARGININA

Dla aminokwasów zasadowych punkt izoelektryczny jest średnią arytmetyczną ze stałej dysocjacji pK_2 i pK_3

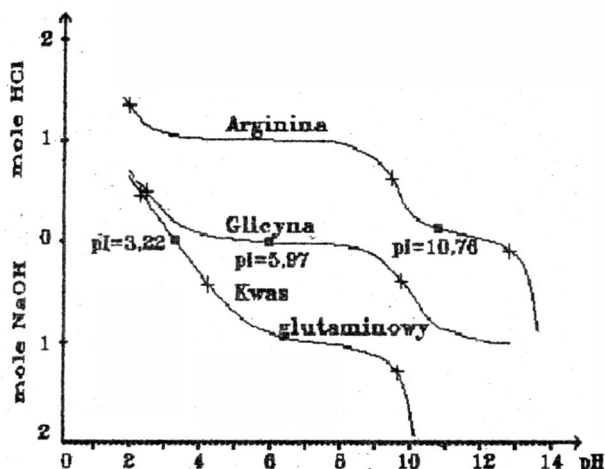
$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_2 + \text{pK}_3}{2}$$

2.2 KRZYWE MIARECZKOWANIA

RYS.1 przedstawia krzywe miareczkowania wodnych roztworów glicyny, kwasu glutaminowego i arginy. Jeżeli do wodnego roztworu glicyny o stężeniu 1 mol/dm^3 i pH ok. 6 będziemy dodawać HCl nastąpi szybkie zmniejszenie wartości liczbowych pH. Amfoteryczne jony dipolarne glicyny zachowują się wówczas jak zasada i przyłączają jony wodorowe. W miareczkowanym roztworze pojawiają się kationy glicyny, mające

AMINOKWASY

charakter słabych kwasów, z którymi sprzężone są dipolarne zasady. Roztwór staje się układem buforowym, pH będzie zmieniało się bardzo powoli. Jeżeli liczba moli dodawanego HCl będzie równa połowie liczby



Rys. 1 Krzywe miareczkowania aminokwasów

Arg	$pK_1 = 1.8$	$pK_2 = 9.0$	$pK_3 = 12.5$	$pI = 10.76$
Gli	$pK_1 = 2.4$	$pK_2 = 9.6$		$pI = 5.97$
Glu	$pK_1 = 2.2$	$pK_2 = 4.3$	$pK_3 = 9.7$	$pI = 3.22$

obecnych w roztworze moli glicyny, to stężenie jonów dipolarnych (sprzężonej zasady) i kationów (słabego kwasu) będzie równe: $pH = pK_1 = 2.4$ GDZIE K_1 JEST STAŁA DYSOCJACJI GRUPY KARBOKSYLOWEJ GLICyny.

Krzywa miareczkowania wykazuje w tym punkcie przegięcie, a roztwór w jego otoczeniu ma najsilniej zaznaczone właściwości buforowe.

Analogiczny przebieg ma krzywa miareczkowania glicyny roztworem wodorotlenku sodowego. Początkowo pH rośnie szybko. Amfoteryczne jony dipolarne glicyny reagują jako słaby kwas z jonami wodorotlenowymi. W roztworze pojawiają się aniony glicyny mające charakter zasad sprzężonych z jonami dipolarnymi. Podobnie jak poprzednio wytwarza

się układ buforowy i pH miareczkowanego roztworu zmienia się bardzo powoli. Po dodaniu zasady, w ilości odpowiadającej połowie obecnych w roztworze moli glicyny, mamy $\text{pH} = \text{pK}_2 = 9$, GDZIE K_2 JEST STAŁA DYSOCJACJI GRUPY AMINOWEJ GLICYNY. W TYM PUNKCIE KRZYWA MIARECZKOWANIA WYKAZUJE PRZEGIECIE. Na rys.1 przedstawiono też rezultaty miareczkowania roztworów wodnych kwasu glutaminowego i argininy.

Krzywa miareczkowania kwasu glutaminowego ma trzy punkty przegięcia. Odpowiadają one trzem stałym dysocjacji, dla których równania są przedstawione wzorami. Podobnie jak glicyna, roztwór kwasu glutaminowego wykazuje - jak widać na wykresie dwa - zakresy buforowania wskutek małej różnicy wartości pomiędzy pK_1 i pK_2 .

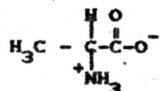
Pierwszy odpowiada otoczeniu punktu izoelektrycznego (przedział pH, 1,5-4,5), drugi otacza punkt $\text{pH} = \text{pK}_3 = 9,7$ (przedział pH 9 - 10,5).

Krzywa miareczkowania argininy ma trzy punkty przegięcia i tyleż zakresów buforowania otaczających punkty o wartościach pH równym odpowiednio pK_1 , pK_2 i pK_3 . Odpowiadają one trzem stałym dysocjacji grup karboksylowej, amoniowej i guanidowej.

2.3. PODZIAŁ AMINOKWASÓW

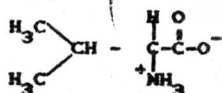
Tradycyjny podział aminokwasów opierał się na zawartości grup karboksylowych i aminowych w ich cząsteczkach oraz na określaniu ich przynależności do związków łańcuchowych lub pierścieniowych. Bardziej racjonalny podział zaproponował w 1960 roku P.KARLSON, opierając się na własnościach struktury molekularnej tzn. łańcuchów bocznych aminokwasów, oznaczanych literą R we wzorach ogólnych. Aminokwasy zostały podzielone na cztery grupy:

2.3.1 AMINOKWASY Z APOLARNYM ŁAŃCUCHEM BOCZNYM R (HYDROFOBOWE)



ALA

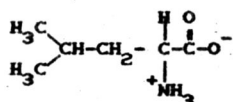
ALANINA kw. 2-aminopropionowy



WAL

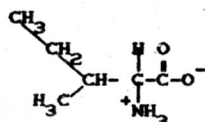
WALINA kw. 2-amino-3-metylomastowy

AMINOKWASY



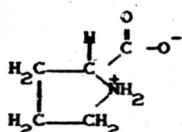
LEU

LEUCYNA kw. 2-amino-4-metyloamylowy



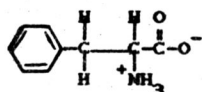
ILE

IZOLEUCYNA kw. 2-amino-3-metyloamylowy



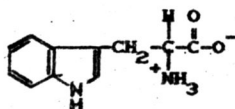
PRO

PROLINA kw. pirolidyno-2-karboksylowy



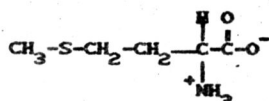
^{Phe}
FEN

FENYLOALANINA kw. 2-amino-3-fenylpropionowy



TRY

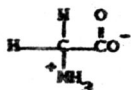
TRYPTOFAN kw. 2-amino-3-indolopropionowy



MET

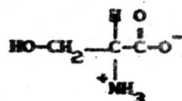
METIONINA kw. 2-amino-4-metyloamylowy

2.3.2. AMINOKWASY Z POLARNYMI GRUPAMI R NIE WYKAZUJĄCYMI ŁADUNKU



GLI

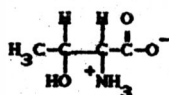
GLICYNA kw. 2-aminooctowy



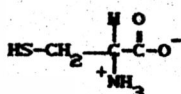
SER

SERYNA kw. 2-amino-3-hydroksypropionowy

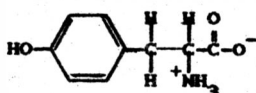
AMINOKWASY



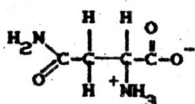
TRE ^{THR} TREONINA kw. 2-amino-3-hydroksy-
masłowy



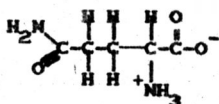
CYS CYSTEINA kw. 2-amino-3-merkaptopropionowy



TYR TYROZYNA kw. 2-amino-3-p-hydroksy-fenylpropionowy

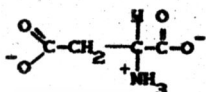


ASP-NH₂ ASPARAGINA amid kw. 2-amino-
bursztynowego
ASN

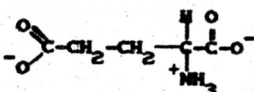


GLU-NH₂ GLUTAMINA amid kw. 2-amino-
glutarowego
GLN

2.3.3. AMINOKWASY NAŁADOWANE UJEMNIE (KWAŚNE)



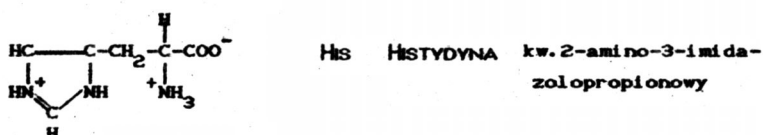
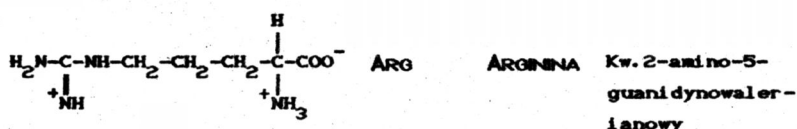
ASP KWAS ASPARAGINOWY
Kw. 2-aminobursztynowy



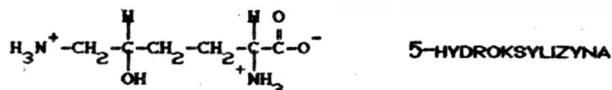
GLU KWAS GLUTAMINOWY
Kw. 2-aminoglutarynowy

AMINOKWASY

2.3.4. AMINOKWASY NAŁADOWANE DODATNIO (ZASADOWE) (ZASADY HEKSONOWE)

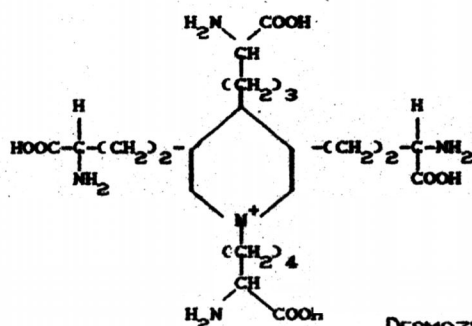


2.3.5. AMINOKWASY RZADKO WYSTĘPUJĄCE W BIAŁKACH

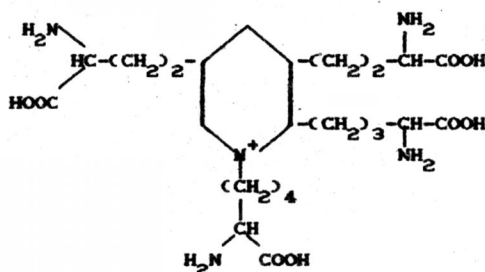


Aminokwasy te zostały wyizolowane z hydrolizatów kałogenu.

AMINOKWASY



DESMOZYNA - połączenie 4 cząsteczek lizyny za pośrednictwem grup R, w wyniku czego tworzy się podstawiony pierścień pirydynowy.



IZODESMOZYNA

Desmozyna i izodesmozyna zostały wyizolowane z hydrolizatów elastyny (białka fibrylarnego). Przypuszcza się, że występują one jedynie w tym białku.

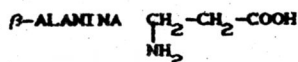
2.3.6. AMINOKWASY NIEBIAŁKOWE

Oprócz 20 aminokwasów powszechnie występujących w białkach, oraz kilku rzadkich, znanych jest jeszcze ponad 150 innych niewykrywanych w białkach. Te niebiałkowe aminokwasy występują w różnych komórkach i tkankach w stanie wolnym lub związanym, przy czym większość z nich wywodzi się z α -aminokwasów białkowych, inne natomiast są β , γ i δ -aminokwasami. Niektóre aminokwasy niebiałkowe pełnią ważną funkcję prekursorów lub metabolitów pośrednich.

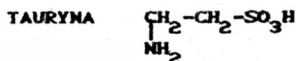
AMINOKWASY

2.3.7. AMINOKWASY NATURALNE NIE WYSTĘPUJĄCE W BIAŁKACH

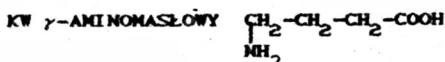
Występowanie i znaczenie



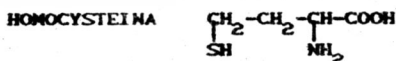
część pantoteiny i koenzymu A



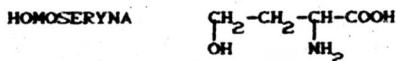
wolna w komórkach, związana w kwasach śluzowych (np. kw. taurocholowy)



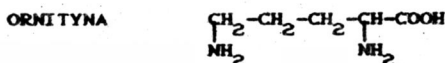
tkanka mózgowa



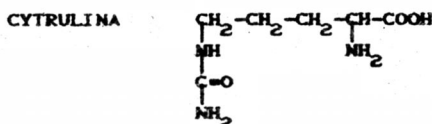
biosynteza metioniny



metabolizm treoniny, asparaginy i metioniny

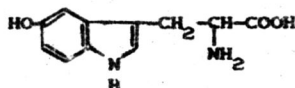


związek pośredni cyklu mocznikowego



związek pośredni cyklu mocznikowego

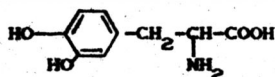
5-HYDROKSY-
TRYPTOFAN



prekursor serotoniny

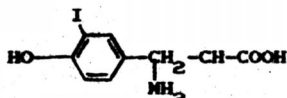
AMINOKWASY

3, 4 DWUHYDROKSY-
FENYLOALANINA
(DOPA)



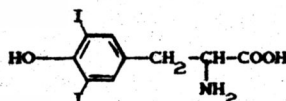
prekursor melanin

MONOJODOTYROZYNA



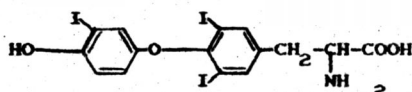
tarczycy i surowica
krewi

3, 5-DWUJODOTYROZYNA



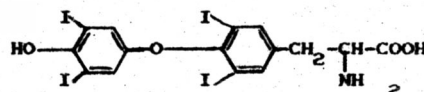
w połączeniu z globu-
liną tarczycy

3, 5, 3', -TRÓJJODO-
TYRONINA



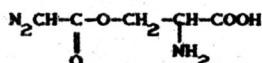
tkanka tarczycy

TYROKSYNA
(3, 5, 3', 5', CZTERO-
JODOTYRONINA)



w połączeniu
z globuliną
tarczycy

AZASERYNA



silny inhibitor
wzrostu nowotworów.

AZASERYNA nie jest naturalnym aminokwasem, lecz wymieniono ją ze względu na znaczenie jako inhibitora różnych etapów biosyntezy puryn.

24 WŁASNOŚCI AMINOKWASÓW

24.1 WIDMA ABSORPCYJNE AMINOKWASÓW

Wprawdzie żaden z 20 aminokwasów nie pochłania światła w zakresie widzialnym, ale w ultrafiolecie obserwuje się absorbancję światła przez trzy aminokwasy: **TYROZYNE, TRYPTOFAN I FENYLOALANINE**. Ze względu

AMINOKWASY - REAKCJE

na to, że większość białek zawiera reszty tyrozyny. pomiar absorbancji światła dokonywany w spektrofotometrze przy długości fali 280nm - można wykorzystać jako szybka i łatwa metoda oznaczania zawartości białka w roztworze.

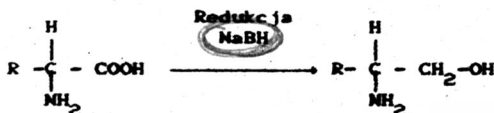
CYSTYNA dzięki obecności grupy disulfidowej absorbuje, chociaż słabo, światło o długości fali 240 nm. Ponadto wszystkie aminokwasy pochłaniają światło w dalekim ultrafiolecie (<220nm).

2.4.2. REAKCJE CHEMICZNE AMINOKWASÓW

Reakcjami charakterystycznymi dla aminokwasów są te reakcje, które dają ich grupy funkcyjne, a mianowicie grupa α-karboksylowa, α-amino-
wa, a także inne grupy znajdujące się w łańcuchach bocznych. Grupy α-karboksylowe wszystkich aminokwasów podlegają reakcjom znanym z chemii organicznej, a prowadzącym do powstawania amidów, estrów i halogenków acylowych.

1. REAKCJA GRUPY KARBOKSYLOWEJ

Często stosowana reakcja w analizie aminokwasów i polipeptydów jest reakcja GRUPY KARBOKSYLOWEJ z silnie redukującym borowodorkiem sodowym prowadząca do powstawania odpowiednich α-AMINOALKOHOLI.



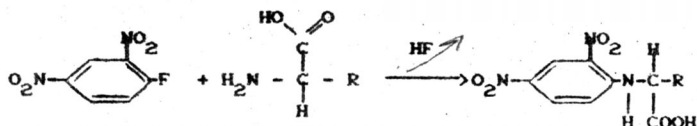
2. REAKCJE GRUPY α - AMINOWEJ

Grupa α-aminowa w aminokwasach może być acylowana przez traktowanie ich halogenkami lub bezwodnikami kwasowymi. Jedną z najbardziej charakterystycznych dla grupy α-aminowej i powszechnie stosowanych reakcji jest REAKCJA NINHYDRYNOWA (patrz dalej).

AMINOKWASY - REAKCJE

A/ REAKCJA Z 1-FLUORO-2,4-DINITROBENZENEM (reakcja F. Sangera)

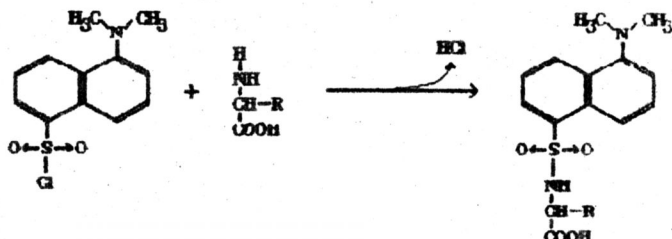
Inna ważna reakcja jest reakcja z 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem, skrót FDNB, wprowadzona przez F. Sangera. Reakcja ta jest stosowana do znakowania i ilościowego oznaczania GRUP AMINOWYCH w aminokwasach i peptydach. W słabo zasadowym roztworze powstają z α -aminokwasów pod wpływem FDNB żółte pochodne 2,4-dinitrofenylowe, zwane DNP-aminokwasami.



Reakcja ta okazała się bardzo przydatna do identyfikacji aminokwasów N-KONCOWYCH w łańcuchach polipeptydowych.

B/ REAKCJA Z CHLORKIEM (1-DIMETYLOAMINONAPHTALENO-5-SULFONYLU) (CHLOREK DANSYLU).

Nowsza metoda stosowana z dużym powodzeniem do określania N-KONCOWEGO aminokwasu jest reakcja grup α -aminowych z chlorkiem dansylu. Pochodne dansylowe aminokwasów można wykrywać i oznaczać w bardzo małych ilościach metodami fluorymetrycznymi, ponieważ grupa dansylowa silnie fluoryzuje.



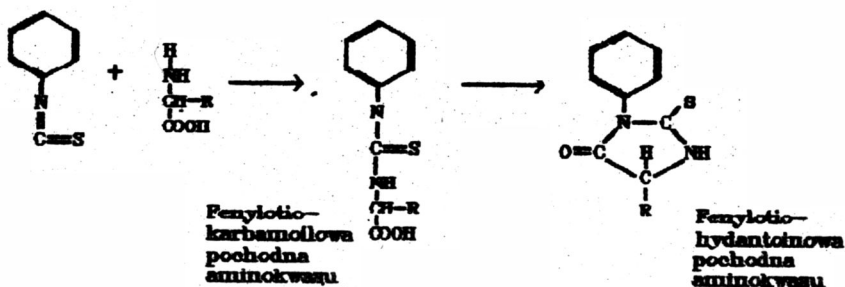
Chlorek dansylu

Dansylowa pochodna aminokwasu

AMINOKWASY - REAKCJE

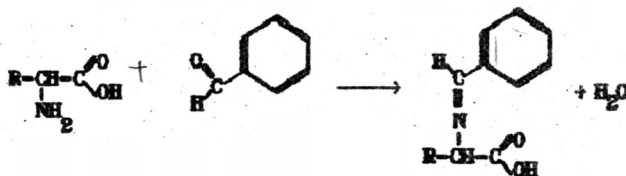
C/ REAKCJA EDMANA

Inna szczególnie przydatna w identyfikacji **N-KONCOWEGO** aminokwasu jest reakcja Edmana. Fenylizotiocyanian reaguje ilościowo z α -aminokwasami dając odpowiednie pochodne fenylotiokarbamoilowe aminokwasów. Reakcja Edmana jest powszechnie stosowana do identyfikacji aminokwasu **N-KONCOWEGO**.



D/ ZASADY SCHIFFA

Grupy α -aminowe aminokwasów reagują też z **ALDEHYDAMI**; reakcja ta jest odwracalna, a powstające bardzo nietrwałe związki noszą nazwę **ZASAD SCHIFFA**.



AMINOKWASY - REAKCJE

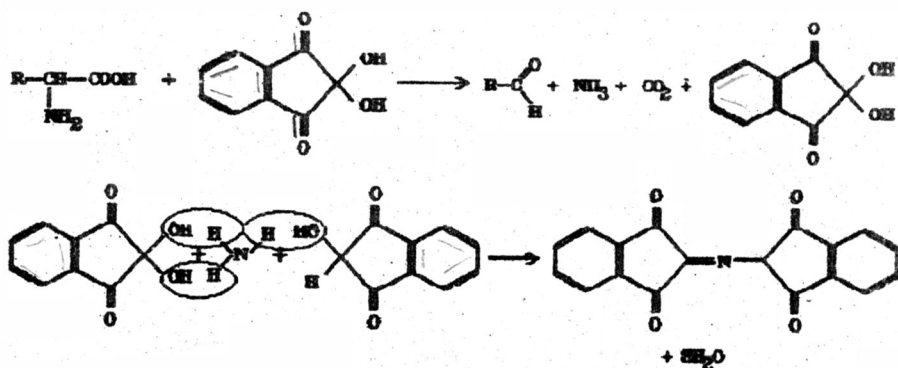
CZEŚĆ PRAKTYCZNA



REAKCJA NINHYDRYNOWA

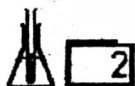
ZASADA: Aminokwasy pod wpływem ninhydryny (wodzian triketohydrinde-
nu) ulegają utlenieniu poprzez iminokwasy do amoniaku, dwutlenku węgla
i uboższego o 1 atom węgla aldehydu. W wyniku kondensacji cząsteczki
zredukowanej i utlenionej ninhydryny z amoniakiem powstaje fioletowo-
niebieskie zabarwienie, którego natężenie jest proporcjonalne do za-
wartości azotu amonowego aminokwasów. Reakcja aminokwasów z ninhydryną
stanowi podstawę ilościowego oznaczania tych związków w metodach gazo-
metrycznych, w których oblicza się ilość wydzielonego CO_2 lub NH_3 oraz
w metodach kolorymetrycznych, w których mierzy się natężenie barwy za-
leżne od stężenia powstałego kompleksu ninhydryny z NH_3 .

WYKONANIE: Do 1 cm^3 0,1% roztworu aminokwasu dodać 2-3 krople roztworu
ninhydryny w acetonie. Probówkę ogrzać do wrzenia. Pojawia się fiolet-
owo- niebieskie zabarwienie, różniące się w zależności od aminokwasu.
Glicyna i alanina dają zabarwienie szkarłatne, fenylalanina niebies-
kie, prolina żółte.



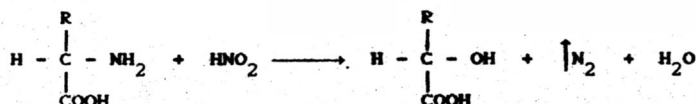
Reakcja ninhydrynowa

AMINOKWASY - REAKCJE



REAKCJA VAN SLYKE'A Z KWASEM AZOTAWYM

ZASADA: Wolne aminokwasy reagują z HNO_2 z wydzieleniem stechiometrycznych ilości N_2



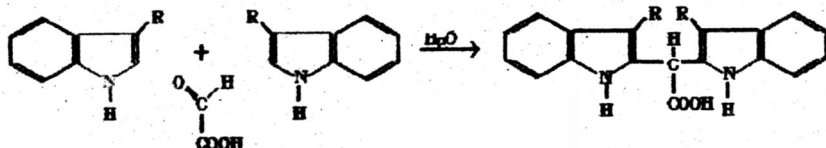
Powyższa reakcja jest podstawą oznaczania ilościowego **AZOTU AMINOWEGO** met. van Slyke'a.

WYKONANIE: Do próbki z 1 cm^3 roztworu azotynu sodowego dodać 1 cm^3 2M roztworu kwasu octowego. Po ustaniu wydzielania się żółtych tlenków azotu dodać 1 cm^3 5% roztworu glicyny. Z roztworu wydzielają się obficie pęcherzyki N_2 .



REAKCJA ADAMKIEWICZA - HOPKINSA NA TRYPTOFAN

ZASADA: W środowisku kwaśnym **TRYPTOFAN** reaguje z aldehydami, dając barwne produkty kondensacji. Jako aldehydu najczęściej używa się glioksalu lub aldehydu mrówkowego.



WYKONANIE: Do 1 cm^3 1% roztworu tryptofanu dodać równą objętość kwasu glioksalowego, zamieszać i podwarstwić ok. 1 cm^3 stęż. H_2SO_4 . Na granicy warstwy wodnej i kwasu siarkowego wystąpi fioletowy pierścień.

AMINOKWASY - REAKCJE



4

ODCZYN MILLONA

ZASADA: Jest to próba na GRUPE FENOLOWĄ. Jedynie TYROZYNA daje pozytywne odczyn Millona. W obecności mieszaniny kwasu azotowego i jonów rtęciowych tyrozyna daje czerwone zabarwienie powstającej soli rtęciowej nitropochodnej tyrozyny.

WYKONANIE: Do 0,5% roztworu tyrozyny lub rozcieńczonej surowicy dodać kilka kropeł odczynnika Millona (jest to mieszanina jonów rtęciowych, rtęciawych, azotanowych i azotynowych powstałych pod działaniem stężonego kwasu azotowego na metaliczną rtęć); przy ogrzewaniu wystąpi czerwone zabarwienie. Podobny odczyn daje roztwór fenolu, moczu oraz liczne białka zawierające tyrozinę.



5

WYKRYWANIE AMINOKWASÓW SIARKOWYCH

ZASADA: Przez gotowanie roztworu aminokwasów siarkowych (CYSTEINA, CYSTYNA) lub białka w wodorotlenku sodowym w obecności octanu ołowiowego powstaje czarny osad siarczku ołowiu. Białka pod wpływem ogrzewania z ługiem rozpadają się na wolne aminokwasy, a obecna w białku cystyna i cysteina przekształcają się w kwas pirogronowy, jony siarczkowe i elementarną siarkę; w obecności Pb^{+2} powstaje czarny osad PbS .

WYKONANIE: Do 1 cm³ roztworu keratyny dodać parę kropli octanu ołowiowego. Probówkę ustawić do wrzącej łaźni wodnej na kilka minut. Płyn ciemnieje. Oziębic, dodać ostrożnie kroplami stężony kwas solny. Wydzieli się siarkowodor. Z cystyny i cysteiny po ogrzaniu w obecności octanu ołowiowego tworzy się czarny osad siarczku ołowiowego. Metionina w tych warunkach reakcji nie daje siarkowodoru i siarczku ołowiowego.



6

REAKCJA PAULY'EGO NA HISTYDYNĘ

ZASADA: Związki imidazolowe, w tym HISTYDYNA, dają czerwone zabarwienie na skutek reakcji diazowania z kwasem sulfanilowym.

AMINOKWASY - REAKCJE

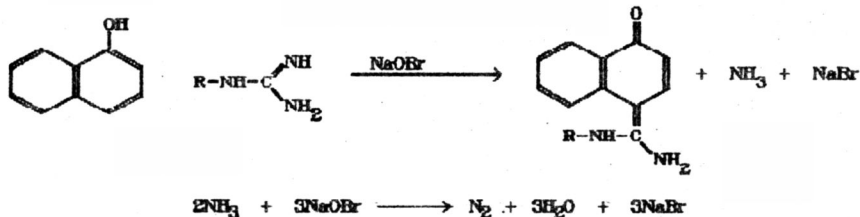
WYKONANIE: Do 1 cm³ roztworu histydyny dodać 2 cm³ kw. sulfanilowego oraz 1 cm³ 5% roztworu azotynu sodowego (świeżo przygotowanego); zmieszać i dodać 1 cm³ 20% NaOH. Histydyna daje żółto-czerwone zabarwienie.



7

REAKCJA SAKAGUCHIEGO NA ARGININE

ZASADA: ARGININA i inne pochodne GUANIDYNOWE utleniają się podbrominem sodowym w obecności α -naftolu do barwnych produktów z uwolnieniem amoniaku. Przy dłuższym działaniu NaOBr barwny produkt utlenia się dalej. Wydziela się wówczas azot z grupy α -aminowej i równocześnie następuje odbarwienie roztworu.



WYKONANIE: Do roztworu białka (argininy) dodać 0,5 cm³ 10% roztworu NaOH, 2 krople 1% etanolowego roztworu α -naftolu. Zamieszać a następnie dodawać kroplami roztwór podbrominu sodowego ciągle mieszając. Czerwone zabarwienie wskazuje na obecność argininy.



8

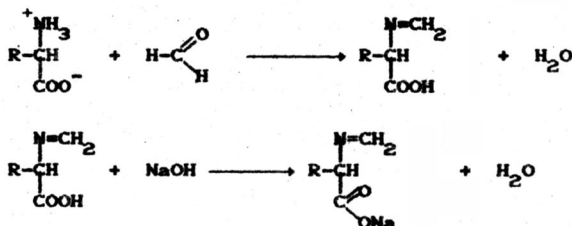
OZNACZANIE AZOTU GRUP AMINOWYCH METODĄ FORMOLEWEGO

MIARECZKOWANIA - METODA SORENSENA

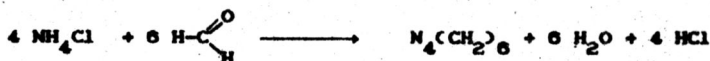
ZASADA: Aminokwasy w wodnych roztworach mają charakter wewnątrzcząsteczkowej soli w wyniku wzajemnego zobojętnienia grupy aminowej i karboksylowej. Grupa COO⁻ aminokwasu zablokowana przez grupę aminową

AMINOKWASY - REAKCJE

nie może być bezpośrednio miareczkowana zasadami. W obecności formaldehydu grupa aminowa aminokwasu reaguje z formaldehydem, dając metylenową pochodną aminokwasu. W wyniku tej reakcji grupa aminowa traci swoje podstawowe właściwości, natomiast grupa karboksylowa w metyleno-aminokwasie zostaje odblokowana i może być miareczkowana.



Liczba uwolnionych grup karboksylowych jest równoważna liczbie związanych z formaldehydem grup amonowych. Rezultat miareczkowania grup karboksylowych określa zatem liczbę grup aminowych i pozwala na oznaczanie zawartości aminokwasów w badanym roztworze. Metoda formolowego miareczkowania aminokwasów jest prosta i wygodna. Należy jednak pamiętać, że uzyskane tą metodą wyniki nie dają w pełni danych o zawartości azotu aminowego. PROLINA bowiem z formaldehydem daje nietrwałe połączenie, co obniża wynik oznaczania, natomiast podwyższa go TYROZYNA zawierająca grupę fenolową. Metody formolowego miareczkowania nie można stosować w obecności soli amonowych, gdyż te z formaliną dają urotropinę, przy czym uwalnia się równoważnik kwasowy:



WYKONANIE: Do 5 ponumerowanych kolb stożkowych odpipetować po 7,5 cm³ zobojętnionego roztworu formaliny. Do przygotowanego roztworu żelatyny (360 cm³)-ogrzanego do temp. 38° (stałą temp. utrzymywać przez cały okres doświadczenia) dodać roztworu pankreatyny (40 cm³). Natychmiast po zmieszaniu żelatyny z pankreatyną odpipetować 5 cm³ tego roztworu do 1 kolbki z formaliną. Po wymieszaniu roztwór miareczkować 0,05 N

AMINOKWASY - REAKCJE

roztworem NaOH do różowego zabarwienia (czas 0). W analogiczny sposób zmiareczkować 5 cm³ próbki trawionego białka, pobierane do kolejnych kolbek z formaliną po upływie 15, 30, 60 i 90 min. od momentu dodania pankreatyny. Zawartość N_{NH_2} w miareczkowanych próbkach wyliczyć ze wzoru.

$$\text{mg } N_{NH_2} = b \times R \times N$$

$$b = a - x$$

gdzie:

R - miligramatom azotu (14mg)

N - miano wodorotlenku sodowego

a - ilość cm³ 0,05 N roztworu NaOH zużyta na zmiareczkowanie próby w określonym czasie

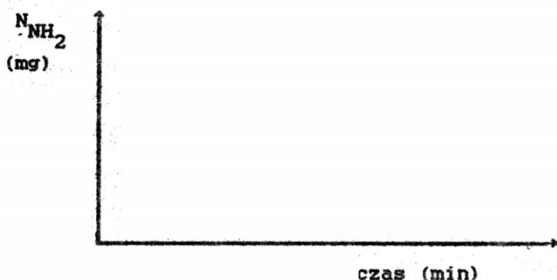
x - wynik miareczkowania dla czasu 0

Wyniki miareczkowania przedstawić w tabeli:

CZAS (minuty)	IŁOŚĆ cm ³ 0,05 N NaOH ZUŻYTA NA ZMIARECZKO- WANIE PRÓBY	b = a - x
0		
15		
30		
60		
90		

Zmiany zawartości azotu aminowego (N_{NH_2}) w próbkach pobieranych z hydrolizatu w kolejnych odstępach czasu, przedstawić w formie wykresu.

PEPTYDY - BUDOWA

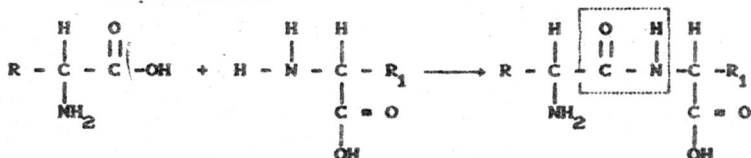


3. PEPTYDY

3.1 BUDOWA PEPTYDÓW

W wyniku reakcji kondensacji pomiędzy grupą karboksylową jednego aminokwasu, a grupą aminową drugiego aminokwasu powstają AMIDY KWASOWE, a wiązanie $-C-NH$ nosi nazwę **WIAZANIA PEPTYDOWEGO**. Połączone w ten sposób dwa aminokwasy tworzą dipeptyd, trzy-tripeptyd i.t.d. Związki zbudowane z kilku - do 10 aminokwasów określa się mianem **OLIGOPEPTYDÓW**, od 10-100 aminokwasów - **POLIPEPTYDÓW**, powyżej 100 aminokwasów - **BIAŁEK**. Peptydy można klasyfikować zarówno pod względem liczby reszt aminokwasowych, jak i pod względem struktury. Peptydy zawierające wyłącznie aminokwasy nazywamy **HOMOMERYCZNYMI**, natomiast te, które zawierają dodatkowe związki nie spotykane w białkach, takie jak np. hydroksy-kwasy **HETEROMERYCZNYMI**.

Ze względu na rodzaje wiązań między jednostkami wyróżnia się PEPTYDYDY HOMODETYCZNE, zawierające tylko wiązania peptydowe. PEPTYDY, HETERODETYCZNE, w których występują wiązania dodatkowe, np. estrowe, disulfidowe czy sulfidowe.



Wiązanie peptydowe

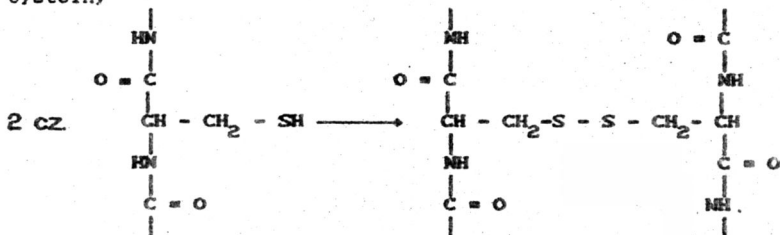
PEPTYDY - BUDOWA

Zwyczajowo (w zapisie od lewej strony) łańcuch peptydowy zaczyna aminokwas z wolną grupą aminową, tzw. "N-KONCOWY". Wszystkie kolejne aminokwasy aż do ostatniego z wolną grupą COOH, tzw. "C-KONCOWEGO", zapisywane są kolejno w prawą stronę. Aminokwas oddając do wiązania peptydowego grupę -OH z grupy -COOH uzyskuje końcówkę -ilo albo -ylo.

Podobnie jak proste grupy amidowe, tak i wiązania peptydowe wykazują wysoki stopień stabilizacji rezonansowej, tzw. "pojedyncze" wiązanie C-N ma w około 40% charakter wiązania podwójnego, a "podwójne" wiązanie C=O ma w takim samym stopniu charakter wiązania pojedynczego. Z faktu tego wynikają dwa ważne następstwa, a mianowicie:

1. GRUPA IMINOWA (-NH) w ugrupowaniu peptydowym nie ujawnia zdolności do jonizacji, czyli przyłączania protonu w zakresie pH 0-14.
2. WIAZANIE C-N nie może ulegać swobodnemu skręceniu, czyli wykazuje właściwości o największym znaczeniu dla trójwymiarowej konformacji łańcuchów polipeptydowych. We wszystkich ułożeniach przestrzennych peptydów i białek grupy amidowe muszą pozostać płaskie. Równie silnie stabilizowane jest położenie trans atomu wodoru w stosunku do grupy karbonylowej.

Obok wiązania peptydowego, drugim ważnym wiązaniem kowalencyjnym spotykanym w cząsteczkach peptydów i białek jest wiązanie DISULFIDOWE tworzone przez utlenienie grupy funkcyjnej -SH pochodzącej z reszty cysteiny



Rozróżniane są WEWNATRZŁANCUCHOWE wiązania DISULFIDOWE które występują w tym samym łańcuchu peptydowym, oraz MIĘDZYŁANCUCHOWE

PEPTYDY - HORMONY

Wiele peptydów w organizmie pełni funkcje HORMONÓW - substancji chemicznych, produkowanych w specjalnych organach lub tkankach i przenoszonych do miejsca działania poprzez układ krwionośny. Znaczna liczba hormonów peptydowych i białkowych produkowana jest w gruczołach wydzielania wewnętrznego (podwzgórze, przysadka, tarczyca, przytarczce, komórki wysiępek Langerhansa w trzustce itp.); pozostała część produkowana jest w specjalnych tkankach. Na tej podstawie rozróżniane są **HORMONY GRUCZOŁOWE I TKANKOWE**. Niektóre ze znanych hormonów peptydowych mają prekursorzy białkowe, z których wskutek działania enzymów następuje uwalnianie tych hormonów. Typowymi przykładami są **ANGIOTENSINA**, **BRADYKININA**, **KALIDYNA**, **INSULINA**. Przypuszcza się, że podobne metaboliczne prekursorzy istnieją dla **WAZOPRESYNY**, **GASTRYNY**, **GLUKAGONU**, **HORMONU PARATYREOTROPOWEGO** i **ACTH**.

3.2. HORMONY PEPTYDOWE

HORMON	MIEJSCE BIOSYNTETY	DZIAŁANIE	STRUKTURA
1. ADRENOKORTYKOTROPINA (ACTH)	Przedni płąt przysadki mózgowej	Pobudza nadnercza do uwalniania kortykoidów	39-polipeptyd liniowy
2. LIPOTROPINA (hormon lipotropowy LH/DH)	Przedni płąt przysadki mózgowej	Lipolityczne	91-polipeptyd
3. MELANOTROPINA (α , β -MSH)	Środkowy płąt przysadki mózgowej	Reguluje metabolizm pigmentu	Peptyd liniowy 13 : 18 reszt odpowiednio
4. TYREOLIBERYNA (czynnik uwalniający tyreotropinę TRF)	Podwzgórze	Uwalnianie tyreotropiny z przedniego płata przysadki	3-peptyd liniowy

PEPTYDY - HORMONY

5. OKSYTOCYN	Podwzgórze	Skurcz macicy (początek porodu); wydzielanie mleka	Heterodetyczny 9-peptyd cykliczny
6. WAZOPRESYNA	Podwzgórze	Wzrost ciśnienia krwi; efekt antydiuretyczny	Heterodetyczny 9-peptyd cykliczny
7. GONADOLIBERYNA	Podwzgórze	Pobudza syntezę i wydzielanie LH i FSH	10-peptyd liniowy
8. SOMATOLIBERYNA (czynnik uwalniający somatotropinę, SRF czynnik uwalniający hormon wzrostu GH-RF)	Podwzgórze	Pobudza syntezę i wydzielanie somatotropiny (STH, GH)	10-peptyd liniowy
9. ANGIOTENSYNA	Osocze	Podnosi ciśnienie krwi; pobudza produkcję aldosteronu w nadnerczach	8-peptyd liniowy
10. BRADYKININA	Osocze	Obniża ciśnienie krwi; zwiększa przepuszczalność naczyń; powoduje skurcz mięśni gładkich	9-peptyd liniowy
11. KALCYTONINA	Tarczyca	Obniża poziom wapnia we krwi	32-Heterodetyczny polipeptyd cykliczny
12. Hormon paratyreotropowy (PARATHORMON)	Przytarczycy	Podnosi poziom wapnia we krwi	84-polipeptyd

PEPTYDY - HORMONY

13. INSULINA	Trzustka (komórki β)	Obniża poziom cukru we krwi; działa antyli- politycznie	51-Heterode- tyczny po- lipeptyd cykliczny
14. GLUKAGON	Trzustka (komórki α)	Glukogenoli- tyczne lipo- lityczne, hi- per glukemiczne	29-polipeptyd liniowy
15. GASTRYNA	Błona śluzowa żołądka	Pobudza wydzie- lanie soków żołądkowych i pepsyny	17-polipeptyd liniowy
16. ENTEROGASTRON	Błona śluzowa żołądka	Antagonistyczne do gastryny	43-polipeptyd
17. CHOLECYSTOKININA (CCK)	Błona śluzowa dwunastnicy	Skurcz woreczka żółciowego	33-polipeptyd
18. PANKREOZYMINA (PZ)	Błona śluzowa dwunastnicy	Pobudza wydzie- lanie bogatego w enzymy soku trzustkowego	33-polipeptyd
19. SEKRETyna	Błona śluzowa	Pobudza trzustkę do syntezy i wy- dzielania soków trawiennych zawierających NaHCO_3	27-polipeptyd liniowy
20. KAERULEINA	Błona śluzowa	Wykazuje działa- nie cholecysto- kinino pankre- ozyminy (CCK-PZ)	10-peptyd
21. BOMBESCyna	Tkanka	Pobudza mięśnie gładkie, nerki, żołądka	14-polipeptyd liniowy

PEPTYDY - NEUROPEPTYDY

3.3. NEUROPEPTYDY

W ostatnich latach dowiedziono, że peptydy mogą pełnić funkcje nośników informacji międzyneuronalnej - są to tzw. NEUROPEPTYDY. Związki te mogą pełnić funkcje analogiczne do funkcji klasycznych neuromediatorów, bądź modulować powoli ale długotrwale aktywność neuronalną.

Cechą charakterystyczną neuropeptydów jest to, że występują one w tkance nerwowej w bardzo niskich stężeniach, a cechuje je wysoka aktywność biologiczna. Inną cechą neuropeptydów jest ich wielofunkcyjność. Często występują one w tkankach nienerwowych, pełniąc tam rolę hormonów (np. insulina, cholecystokina, sekretyna) lub hormonów tropowych (hormony przysadkowe) pełniąc rolę liberelin podwzgórzowych. Do neuropeptydów zaliczono wszystkie peptydy znalezione w ośrodkowym układzie nerwowym. Jest ich kilkadziesiąt, a wśród nich:

OXYTOCINA, WAZOPRESYNA, ACTH, β -LIPOTROPINA, α -MELANOTROPINA, γ -MELANOTROPINA, INSULINA, GLUKAGON, CHOLECYSTOKINA, KALCYTONINA, ANGIOTENSINA i inne.

Bardzo interesującą grupę neuropeptydów stanowią peptydy OPIOIDOWE wykazujące działanie morfinopodobne. Do substancji tych zaliczane są ENKEFALINY (*enkephalos* - mózg) oraz ENDORFINY (*endogenne morfiny*). Obecnie znane są dwie enkefaliny: Met-ENKEFALINA enkefalina metioninowa (TYR-GLY-GLY-PHE-MET) i Leu-ENKEFALINA enkefalina leucynowa (TYR-GLY-GLY-PHE-LEU).

Do ENDORFIN zaliczane są TUFTSYNA -(THR-LYS-PRO-ARG), KIOTORFINA (TYR-ARG), α -NEOENDORFINA - 9 peptyd, zawierający w swojej cząsteczce sekwencję Leu-enkefaliny, β -NEOENDORFINA - 9 peptyd - stanowiący (1-9) fragment α -neoendorfiny.

Wymienione peptydy są substancjami mającymi właściwości znoszenia bólu. Do NEUROPEPTYDÓW należy również SUBSTANCJA P - 11 peptyd, związek który powoduje uczucie bólu. Uważa się, że enkefaliny hamują wydzielanie substancji P..

PEPTYDY - ANTIBIOTYKI

3.4. ANTIBIOTYKI PEPTYDOWE

Do peptydów należą również niektóre antybiotyki, produkty metabolizmu mikroorganizmów: **GRAMICYDYNA S** - cykliczny dziesięciopeptyd, **GRAMICYDYNA A** - liniowy 15 peptyd - produkty wyizolowane z hodowli *Bacillus Brevis*. Działają one na bakterie Gram-dodatnie. Z przesączów hodowli *Bacillus Licheniformis* wyizolowano **BACYTRACYNE A** - sześćiopeptydowy układ cykliczny. Bacytracyny działają na bakterie Gram-dodatnie i stosowane są do leczenia zakażeń skóry. **POLIMYKSYNY** - cykliczne peptydy zawierające kwasy tłuszczowe, produkowane przez *Bacillus Polymyxa* - działają na bakterie Gram-ujemne, szczególnie na *Pseudomonas Pyocyanea*. Polimyksyny są stosowane do leczenia biegunek, nieżytu żołądka i jelit, zapalenia opon mózgowych oraz innych zakażeń, których leczenie innymi antybiotykami nie jest skuteczne. Lista antybiotyków peptydowych jest długa i nie sposób wszystkie tu omówić.

BIALKO - STRUKTURA

4 BIAŁKO

4.1 STRUKTURA BIAŁEK

Cząsteczka białka jest trójwymiarowym układem jednego lub kilku łańcuchów polipeptydowych, z których każdy jest połączeniem wielu reszt aminokwasowych wiązaniami peptydowymi. Wyróżnia się w niej struktury I, II, III, IV rzędową.

STRUKTURA I RZĘDU tj. sekwencje aminokwasów, warunkują wiązania peptydowe (kowalencyjne) $-C-NH-$. Donosił odkryciem było stwierdzenie, że wiązanie peptydowe jest sztywnym i płaskim elementem strukturalnym. Atom wodoru grupy $NH-$ znajduje się prawie zawsze w pozycji trans w stosunku do atomu tlenu grupy karbonylowej.

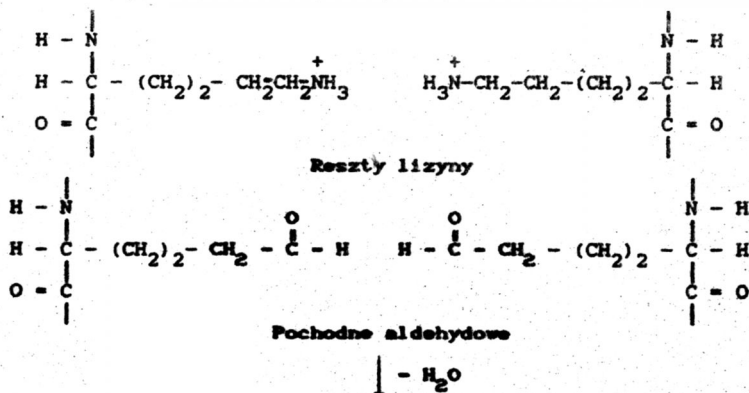
STRUKTURA II RZĘDU opisuje wzajemne przestrzenne ułożenie reszt aminokwasowych, sąsiadujących ze sobą w sekwencji liniowej. Niekiedy sposób wzajemnego przestrzennego ułożenia reszt aminokwasowych powtarza się regularnie i wtedy białko ma strukturę periodyczną. Przykładem struktury II rzędowej jest α -HELISA, β -HARMONIJKA lub HELISA KOLAGENU.

α -HELISA ma kształt cylindra. Ciasno skrecony łańcuch główny polipeptydu tworzy wewnętrzna część cylindra, a łańcuchy boczne aminokwasów sterczą na zewnątrz w ułożeniu helikalnym. α -Helise stabilizują wiązania WODOROWE pomiędzy grupami $-NH$ i $-CO$ głównego łańcucha. Grupa $-CO$ każdego aminokwasu wiąże się wiązaniem wodorowym z grupą $-NH$ kolejnego aminokwasu, zajmującego w sekwencji liniowej pozycję wysuniętą do przodu o cztery reszty aminokwasowe.

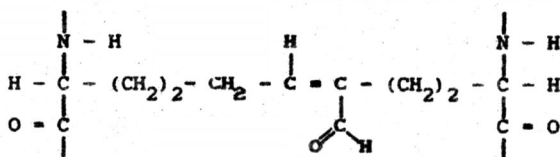
$-C=O \dots H-N-$ — wiązanie wodorowe

Obok α -helisy w strukturze II rzędowej stwierdzono inny regularnie powtarzający się układ przestrzenny białka - nazywany strukturą pofalowanej kartki lub β -HARMONIJKI. W odróżnieniu od ciasno upakowanego łańcucha polipeptydowego w α -helisie, w β -harmonijce jest on prawie całkowicie rozciągnięty, tworząc strukturę płaską. β -Harmonijka stabilizowana jest wiązaniami WODOROWYMI pomiędzy grupami $-CO$ i $-NH$, należącymi do odrębnych łańcuchów polipeptydowych. Natomiast w α -helisie

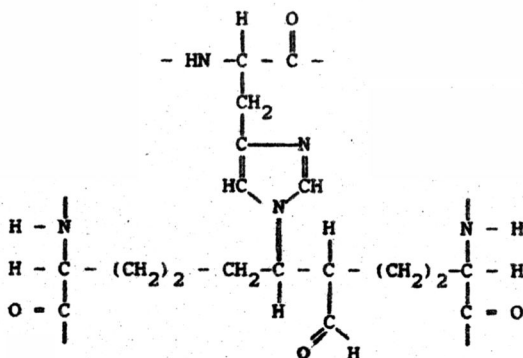
wiążą się grupy $-CO$ i $-NH$ aminokwasów, należących do tego samego łańcucha polipeptydowego. Jak dotychczas znaczny udział struktury β stwierdzono tylko w FIBROINIE JEDWABIU. Trzecią z kolei strukturą regularną jest HELISA KOLAGENU (białka bogatego w glicynę, prolinę i hydrokсыprolinę). Kolagen jest zbudowany z trzech nici skreślonych helikalnie o strukturze zupełnie odmiennej od struktury α -helisy o bardzo dużym skoku śruby. Te trzy nici okracają się wokół siebie na kształt superhelikalnej liny. W pojedynczej nici kolagenu nie występują wiązania wodorowe. Zamiast nich helikalna struktura stabilizuje steryczne odpychanie pirolidynowych pierścieni proliny. Dopiero TRZY nici łączą się ze sobą wiązaniami WODOROWYMI. Podstawową cechą strukturalną włókien kolagenowych jest szeregowe przesunięcie cząsteczek tropokolagenu (prekursor kolagenu) w stosunku do sąsiednich cząsteczek o $1/4$ długości cząsteczki. Kolagen podobnie jak fibroina jest stabilizowany kowalencyjnymi wiązaniami poprzecznymi. We włóknie kolagenu powstają dwa rodzaje wiązań poprzecznych: WEWNĄTRZCZĄSTECZKOWE (w jednostce tropokolagenu), oraz MIEDZYZCZĄSTECZKOWE (pomiędzy różnymi cząsteczkami tropokolagenu). Wewnątrzcząsteczkowe wiązania poprzeczne w kolagenie tworzą łańcuchy boczne lizyny. Pierwszym etapem ich powstawania jest przemiana ϵ -aminowego końca lizyny w aldehyd, jako wynik reakcji katalizowanej przez oksydazę lizynową. Dwa takie aldehydy ulegają następnie kondensacji aldolowej.



BIAŁKA - STRUKTURA



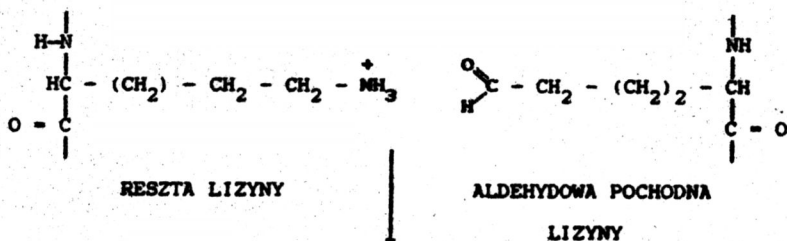
Aldolowe wiązania poprzeczne

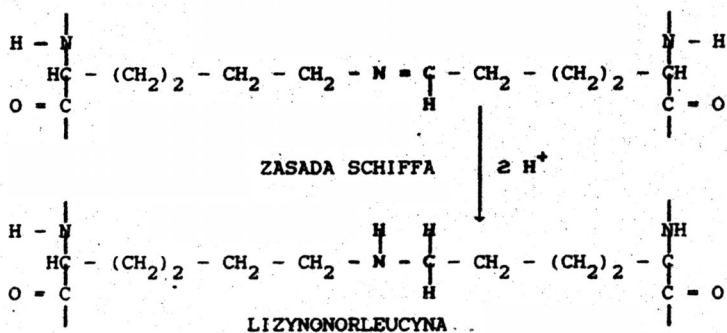


Łącznik histydynowo-aldolowy

Rys.

Powstawanie aldolowego wiązania poprzecznego między dwiema resztami lizyny i łącznika histydynowo - aldolowego.





Rys . Powstawanie Lizyno - norleucynowego wiązania poprzecznego
w kolagenie i elastynie

Miedzyłańcuchowe połączenia w kolagenie i elastynie - to wiązanie
poprzeczne HISTYDYNA - ALDOL

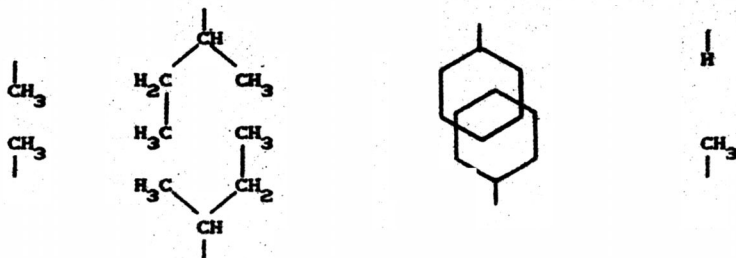
STRUKTURA III rzędowa tj. ułożenie łańcuchów polipeptydowych w przestrzeni warunkująa różnego typu wiązania chemiczne. Kowalencyjne (-S-S-), wodorowe, hydrofobowe, jonowe, siły van der Waalsa.

Wiązanie DWUSIARCZKOWE jest jedynym typowo KOWALENCYJNYM wiązaniem poprzecznym, występującym pomiędzy łańcuchami bocznymi w cząsteczce białka. Powstaje ono w wyniku reakcji utleniania reszt cysteiny.

Wiązania WODOROWE powstają w wyniku oddziaływań między atomami O i N jednej cząsteczki, a grupami -NH i -OH drugiej cząsteczki. Według ostatnich badań w roztworach wodnych energia wiązań wodorowych między atomem wodoru, związanym z azotem, a atomem tlenu wynosi najwyżej 6.3 KJ/mol. Prawdopodobnie optymalnym warunkiem do tworzenia wiązania wodorowego jest ustawienie atomu - NH...O=C w linii prostej w odległości ok. 0.28 nm. Oprócz wiązań wodorowych między elementami strukturalnymi głównego łańcucha peptydowego powstają także wiązania wodorowe, w których mogą brać udział grupy hydroksylowe tyrozyny, grupy karboksylowe, imidazolowy atom azotu histydyny itp.

Dla stabilizacji konformacji ważne są oddziaływania HYDROFOBOWE (niepolarne). Przy zbliżaniu się dwóch grup niepolarnych zaczyna

występować niewielkie przyciąganie, spowodowane zniekształceniem chmury elektronowej. Przykłady wiązań hydrofobowych przedstawia rys. 4.



Rys. Wiązania hydrofobowe spotykane w białkach

Dodatkową możliwość stabilizowania konformacji peptydów i białek stwarzają **WIAZANIA JONOWE** $\text{NH}_3^+ \text{O}^- \text{C}$. Powstają one w wyniku elektrostatycznych oddziaływań między dodatnimi i ujemnymi ładunkami, zlokalizowanymi na grupach aminowych i karboksylowych na końcach łańcucha głównego oraz łańcuchach bocznych, a także na grupie guanidynowej argininy. Wiązanie van der Waalsa, jest to nieswoiste oddziaływanie między dwoma atomami gdy zbliżą się do siebie na odległość 0,3 - 0,4 nm. W białkach składających się z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego można określić jeszcze jeden poziom organizacji przestrzennej, a mianowicie **STRUKTURĘ CZWARTORZĘDOWĄ** która opisuje wzajemne ułożenie łańcuchów polipeptydowych w przestrzeni. Każdy z tych łańcuchów nazywa się w takim przypadku podjednostką danego białka. Wyniki badań wykazały, że sekwencja aminokwasów (identyczna dla danego białka, określonego gatunku) zawiera informację o założonej strukturze przestrzennej. **JEDNYM SŁOWEM SEKWENCJA OKREŚLA KONFORMACJĘ.**

Białka są klasyfikowane w rozmaity sposób, na przykład: ze względu na ich pochodzenie (białka roślinne, zwierzęce, wirusowe, bakteryjne), lub ze względu na ich występowanie w różnych organach (białka

BIALKA - KLASYFIKACJA

plazmy, mięśni, mleka, jaj itp.) albo w organellach komórkowych (białka rybosomalne, jądrowe, mikrosomalne, błon itp.). Jako inne kryterium można przyjąć ich ogólne funkcje biochemiczne (np. białka enzymatyczne, ochronne, strukturalne, transportowe, zapasowe itd.). Najwcześniejsza klasyfikacja białek uwzględniała różnicę w rozpuszczalności oraz kształcie cząsteczki:

4.2.1 SFEROPROTEINY BIAŁKA GLOBULARNE O KSZTAŁCIE KULISTYM

Rozpuszczalne w wodzie, rozcieńczonych roztworach soli.

4.2.2 SKLEROPROTEINY- BIAŁKA FIBRYLARNE O KSZTAŁCIE WŁÓKIEŃ.

Nierozpuszczalne w wodzie, roztworach soli, odporne na działanie kwasów, zasad, proteaz.

Następna klasyfikacja oparta jest na składzie chemicznym i dzieli białka na dwa typy: **PROSTE** (homoproteiny) i **ZŁOŻONE** (heteroproteiny).

Do białek prostych możemy więc zaliczyć zarówno sfero- jak i skleroproteiny. Wśród **SFEROPROTEIN** możemy wyróżnić:

1. ALBUMINY

Albuminy są białkami o małej masie cząsteczkowej. Dobrze rozpuszczają się w wodzie, rozcieńczonych roztworach soli w zakresie pH od 4 do 8.5, a także łatwo krystalizują. Można je wytrącić bardzo stężonym roztworem SIARCZANU AMONOWEGO (70-100% nasycenia). Kwasowy charakter albumin wynika z dużej zawartości (20-25%) kwasów: GLUTAMINOWEGO i ASPARAGINOWEGO. Do tej grupy zaliczamy ALBUMINE SUROWICY, α -LAKTOALBUMINE, OWOALBUMINE BIAŁKA KURZEGO oraz ALBUMINY ROSLINNE.

ALBUMINY SUROWICY (masa cząsteczkowa 67000) są głównym składnikiem białek surowicy, występującym w ilości około 60%. Najważniejszą funkcją fizjologiczną tego białka jest regulacja ciśnienia osmotycznego krwi. Wykazuje ono dużą zdolność wiązania jonów Na^+ , K^+ i Ca^{++} jak

BIALKA - KLASYFIKACJA

również hormonów, kwasów tłuszczowych i leków. Cząsteczka albuminy surowicy ludzkiej jest łańcuchem polipeptydowym, złożonym z 579 amino-kwasów, powiazanym poprzecznie siedemnastoma mostkami disulfidowymi.

LAKTOALBUMINA występuje w mleku ssaków. Jej cechą charakterystyczną jest duża odporność na działanie wysokiej temperatury. Odmienne od albuminy surowicy α -laktoalbumina zawiera oligosacharyd, który jest przyłączony do łańcucha polipeptydowego poprzez grupę β -karboksylową reszty kwasu asparaginowego. Ludzka α -laktoalbumina (masa cząsteczkowa 14176) składa się z 123 reszt i zawiera 4 mostki disulfidowe.

OWOALBUMINA (m.c. 44000) zawiera 3,2% węglowodanów oraz resztę kwasu fosforowego, która przyłączona jest do łańcucha bocznego seryny.

ALBUMINY ROSLINNE występują w małych ilościach w nasionach, np. RYCINA w nasionach rącznika (*Rhynus*), LEUKOZYNA w nasionach różnych zbóż, LEGUMELINA w nasionach roślin strączkowych (*Leguminasae*). Rycyna z abryną (z nasion *Abrus precitertus*) wykazują właściwości toksyczne. RYCINA i podobna strukturalnie ABRYNA działają jako inhibitory biosyntezy białka i wykazują działanie antynowotworowe.

2. GLOBULINY

Globuliny mają większą masę cząsteczkową niż albuminy i występują praktycznie we wszystkich komórkach zwierzęcych i roślinnych.

Do tej jednolitej, szerokiej klasy białek należy wiele enzymów, białek surowicy, przeciwciał, białek mleka, glikoproteidów i białek zapasowych roślin.

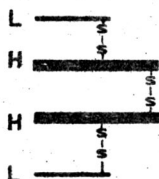
Globuliny są nierozpuszczalne lub nieznacznie rozpuszczalne w wodzie pozbawionej soli. Rozpuszczają się natomiast w roztworach soli. Globuliny można frakcjonować, wytracając stopniowo siarczanem amonowym.

α -LAKTOGLOBULINA (m.c. 36726) jest najważniejszym składnikiem białkowym mleka krowiego (3g/dm^3).

BIALKA - KLASYFIKACJA

GLOBULINY SUROWICY są klasyfikowane zgodnie z ich zachowaniem w elektroforezie bibułowej jako α_1 , α_2 , β i γ -globuliny. γ -Globuliny są klasą zawierającą przeciwciała.

Przeciwciała są IMMUNOGLOBULINAMI produkowanymi przez komórki limfatyczne w odpowiedzi na kontakt z ANTYGENEM. Immunoglobuliny reagują specyficznie z antygenem, a w wyniku tej reakcji następuje inaktywacja antygeny przez precypitację (strącanie), aglutynację i itp. Kompletna cząsteczka immunoglobuliny składa się z DWOCH ŁANCUCHÓW LEKKICH (L) o masie cząsteczkowej 23000, oraz pary ŁANCUCHÓW CIĘŻKICH (H) o masie cząsteczkowej 53000-75000 (i pięciu typach łańcuchów). Immunoglobuliny różnią się rodzajem łańcucha. Wśród immunoglobulin wyróżnia się 3 klasy główne: IgG, IgA, IgM oraz dwie klasy podrzędne IgD i IgE. Każda z tych grup składa się z dwóch podgrup, różniących się typem łańcucha LEKKIEGO.



W IgG znajduje się ok. 80% wszystkich przeciwciał odpornościowych krwi; przeciwciała antywirusowe przeciwciała przeciw bakteriom (gram +), antytoksyny. IgG są jedynymi globulinami odpornościowymi, które przenikają przez barierę łożyskową z krążenia matki do krążenia płodu.

IgA są obecne w ślinie, sianie, łzach, w wydzielinach błonki przewodu pokarmowego i oddechowego.

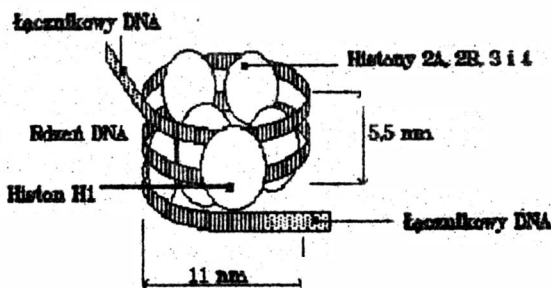
W IgM znajduje się 5 do 10% wszystkich przeciwciał surowicy, są to przeciwciała wassermanowskie, zimne aglutyny i izohemaglutyny. Cząsteczka IgM jest pentamerem podjednostek analogicznych do pozostałych immunoglobulin. Wielkość cząsteczek IgM utrudnia im wędrowanie poza przestrzeń naczyniową i dlatego 80% IgM znajduje się we krwi.

3. HISTONY

HISTONY są białkami zasadowymi (duża zawartość lizyny, argininy) o małej masie cząsteczkowej, rozpuszczalnymi w wodzie i kwasach. Białka te nie są specyficzne dla określonej tkanki i występują we wszystkich

BIALKA - KLASYFIKACJA

komórkach eukariotycznych, gdzie tworzą odwracalne kompleksy z DNA (NUKLEOHISTONY = NUKLEOSOMY) a zatem odgrywają ważną rolę w procesie niespecyficznej represji genów. W NUKLEOSOMACH WYRÓŻNIAMY: Histony o małej zawartości lizyny H_2A i H_2B wykazujące zróżnicowanie gatunkowe i Histony o dużej zawartości argininy H_3 i H_4 nie różniące się między gatunkami. Histon H_1 łączący się luźno z nicią DNA po zewnętrznej stronie cząsteczki rdzeniowej, a także z DNA ŁĄCZNIKOWYM.



Rys. Schemat nukleosomu (cyt. za L. STEYER, Biochemia, PWN, Warszawa 1986, str.740)

4. PROLAMINY

PROLAMINY charakteryzują się znaczną zawartością KWASU GLUTAMINOWEGO (30-45%) i PROLINY ok.15%. Nazwa tej klasy białek ma związek z dużą zawartością proliny. Prolaminy są nierozpuszczalne w wodzie, roztworach soli, ale rozpuszczają się w 50-90% roztworze etanolu. GLIADYNA (pszenica i żyto) oraz HORDENINA (jęczmień) są ważnymi białkami zbóż.

BIALKA - KLASYFIKACJA

5. PROTAMINY

Białka należące do tej grupy SA BARDZIEJ ZASADOWE NIŻ HISTONY, co wynika z większej zawartości ARGININY (80-85%). Są one rozpuszczalne w wodzie i kwasach. Znajdują się w jądrach komórkowych w połączeniach z DNA. Protaminy mają małe masy cząsteczkowe 4000-4500 i wyodrębnia się je głównie ze spermy rybnej.

6. GLUTELINY

Nazwa tych białek ma związek z DUŻĄ ZAWARTOŚCIĄ KWASU GLUTAMINOWEGO (do 45%). Gluteliny są rozpuszczalne w wodzie, roztworach soli i rozcieńczonym alkoholu, a także w roztworach zasadowych i kwasnych. Do tej grupy należą między innymi: GLUTENINA (pszenica), ORZYNINA (ryż) GLUTENINA I GLIADYNA składają się na lepkie białko (gluten) maki pszennej i żytniej.

4.2.2. SKLEROPROTEINY - BIAŁKA FIBRYLARNE

Z punktu widzenia konformacji łańcucha wyróżnia się trzy typy skleroprotein: o strukturze α -HELIKALNEJ, β -HARMONIIJKI i strukturze PÓTRÓJNEJ HELISY. Najważniejszymi białkami poszczególnych typów są odpowiednio:

α -KERATYNA, β -KERATYNA I BIAŁKA JEDWABIU ORAZ KOLAGEN.

KERATYNA jest to białko nierozpuszczalne w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli. Występuje w zewnętrznych zrogowaciałych warstwach naskórka, w piórach, rogach, kopytach, paznokciach i włosach. Keratyna może mieć strukturę drugorzędową α -helisy i wówczas nosi nazwę α -KERATYNY bądź strukturę β -harmonijki i wtedy nazywa się ją β -KERATYNĄ.

Keratyna włosa może występować w obu tych odmianach. Naturalna odmiana jest α -KERATYNA. Po poddaniu włosa działaniu sił rozciągających w podwyższonej temperaturze, struktura α -helisy ulega przekształceniu w β -harmonijkę, a towarzyszy temu prawie dwukrotne wydłużenie włosa.

BIALKO - STRUKTURA

przemiana ta jest odwracalna.

Struktura **β -HARMONIKI** występuje w fibroinie - białku jedwabiu produkowanym przez larwy jedwabnika.

KOLAGEN - białko o strukturze potrójnej helisy zostało omówione wyżej. Podobną budowę do kolagenu ma **ELASTYNA** - białko włókien sprężystych. Występuje w większości tkanek łącznych razem z kolagenem i polisacharydami. Duże ilości elastyny znaleziono w ścianach naczyń krwionośnych, a szczególnie w łuku aorty w pobliżu serca oraz a wiązadłach.

ELASTYNA ma skład aminokwasowy podobny do kolagenu: 1/3 reszt stanowi GLICYNA, bogata jest w PROLINE. Odróżnia się od kolagenu brakiem HYDROKSYLIZYNY. Tylko w elastynie wykryto desmozyne i izodesmozyne - pochodne czterech reszt lizyny (patrz rozdział aminokwasy). Przypuszcza się, że tego typu wiązania poprzeczne mogą decydować o sprężystości włókien elastynowych, umożliwiając im po naprężeniu powrót do pierwotnego rozmiaru i kształtu.

4.3. BIAŁKA ZŁOŻONE

Białka złożone są klasyfikowane wg. ich nieaminokwasowych części składowych, istotnych dla ich funkcji. połączonych z łańcuchami peptydowymi wiązaniami kowalencyjnymi, jonowymi lub koordynacyjnymi.

4.3.1 FOSFOPROTEINY

Fosfoproteiny zawierają grupy KWASU FOSFOROWEGO, które zwykle połączone są wiązaniami ESTROWYMI z grupami hydroksylowymi łańcuchów bocznych SERYNY lub rzadziej TREONINY.

Do ważnych fosfoproteidów należą **KAZEINY**. Znajdują się one w dużej ilości w mleku krowim (25g/dm^3), stanowią około 79% białek zawartych w mleku. Do grupy fosfoproteidów należą także **FOSFOWITYNA I WITELINA** z żółtka jaja kurzego. Pięćdziesiąt procent reszt aminokwasowych fosfowityny stanowią reszty fosfoseryny.

BIĄŁKA - KLASYFIKACJA

4.3.2 CHROMOPROTEINY

Białka te zawierają CHROMOFOROWĄ GRUPĘ PROSTETYCZNĄ. Bardzo duże znaczenie mają hemoproteiny, które zawierają grupy hemowe.

HEMOGLOBINA - składa się z czterech grup hemowych i czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch łańcuchów α złożonych z [141] aminokwasów i dwóch łańcuchów β złożonych z [146] aminokwasów. Transportuje ona tlen cząsteczkowy, przyłączony koordynacyjnie do Fe^{++} w grupie hemowej, z płuc do tkanek.

MIOGLOBINA - zawiera jedną grupę hemową z Fe^{++} i jeden łańcuch polipeptydowy złożony z [153] aminokwasów. Mioglobina występująca w mięśniach służy jako nośnik tlenu, przy czym tlen wiąże się z mioglobina silniej niż z hemoglobina.

CYTOCHROM C - białko przenoszące elektrony, zawiera grupę hemową i jeden łańcuch polipeptydowy złożony z [104] aminokwasów, ale w odróżnieniu od mioglobiny, grupa hemowa w cytochromie C jest przyłączona do apoproteidu kowalencyjnie: w wyniku utworzenia mostków sulfidowych przez łańcuchy boczne reszt cysteinowych.

Do hemoprotein należą również enzymy: KATALAZA I PEROKSYDAZA.

4.3.3. LIPOPROTEINY

LIPOPROTEINY - są produktami przyłączenia lipidów do specjalnych białek zwanych apolipoproteinami. Dzięki temu połączeniu nierozpuszczalne w wodzie lipidy mogą być transportowane we krwi, stanowiącej środowisko wodne.

Funkcją lipoprotein jest przyłączanie i oddawanie lipidów oraz wymiana apoprotein. Składnikiem białkowym lipoprotein jest osiem głównych klas apoprotein oznaczonych jako:

APO-AI, APO-AII, APO-AIII, APO-B, APO-CI, APO-CII, APO-CIII i APO-E

BIĄŁKA - KLASYFIKACJA

oraz klasy uboczne. AFOPROTEINY klasy A mają masy cząsteczkowe około 20000, podczas gdy cząsteczki AFOPROTEINY klasy C - są znacznie mniejsze - zawierają 60 - 80 reszt aminokwasowych, należą więc do peptydów. Białka są rozmieszczone na powierzchni cząsteczki lipoproteinowej, natomiast lipidy tworzą jej rdzeń.

Duża zawartość lipidów, mających mniejszą gęstość od wody, powoduje, że gęstość lipoprotein jest stosunkowo mała. Właściwość ta została wykorzystana do rozdzielania lipoprotein metodą ultrawirowania w gradiencie gęstości. Gdy zastosuje się np. jako rozpuszczalnik roztwór soli o określonej gęstości $\rho = 1.063 \text{ g/cm}^3$, wówczas wszystkie lipoproteiny, których gęstość jest mniejsza, wypłyną i zbiorą się na powierzchni cieczy. Tą metodą ustalono klasy lipoprotein o różnej gęstości oraz frakcje chylomikronów.

CHYLOMIKRONY mają gęstość 0.94 g/cm^3 i są w zasadzie kropelkami tłuszczu z porowatą osłonką białkową (zawartość białka 1 - 2%).

LIPOPROTEINY o bardzo małej gęstości - VLDL (very low density lipoproteins) - $0.94 - 1.006 \text{ g/cm}^3$, zawierają 8-10% białka i od 45-65% tłuszczu. Pozostałymi składnikami lipoprotein są fosfolipidy, estry cholesterolu i wolny cholesterol.

LIPOPROTEINY o małej gęstości LDL (low density lipoproteins) - $1.006 - 1.063 \text{ g/cm}^3$ zawierają 20-25% białka i 4-8% tłuszczu. Frakcja ta jest szczególnie bogata w estry cholesterolu - zawartość ich sięga do 50%.

LIPOPROTEINY o dużej gęstości HDL (high density lipoproteins) - $1.063 - 1.210 \text{ g/cm}^3$ zawierają 40-55% białka, 2-7% tłuszczu, 26-32% fosfolipidów i 15-20% estrów cholesterolu.

Rutynowa metoda badania surowicy ludzkiej jest elektroforeza. Określonym frakcjom elektroforetycznym można przyporządkować różne lipoproteiny. CHYLOMIKRONY w elektroforezie bibułowej i na żelu agarowym nie migrują, lecz pozostają w położeniu startowym, w elektroforezie swobodnej na octanie celulozy i w blokach skrobiowych znajduje się je w frakcji α_2 GLOBULIN. LIPOPROTEINY VLDL zawarte są we frakcji pre

BIALKA - KLASYFIKACJA

β -GLOBULIN, LIPOPROTEINY LDL związane są z frakcją β -GLOBULIN, natomiast LIPOPROTEINY HDL znajdują się we frakcji α_1 -GLOBULIN. CHYLOMIKRONY są wytwarzane przez komórki śluzówki jelita w procesie wchłaniania produktów hydrolizy tłuszczów i przekazywane do układu limfatycznego. Mają one postać kuleczek o średnicy od 75 - 1000 nm. W krwioobiegu chylomikrony ulegają szybkiemu rozkładowi. Przejmują one od lipoprotein HDL apoproteiny C III, działająca jako aktywator lipazy lipoproteinowej. Enzym ten jest zlokalizowany na powierzchni komórek śródbłonkowych naczyń krwionośnych i w komórkach tkanki tłuszczowej, hydrolizuje tłuszcze chylomikronów a uwolnione kwasy tłuszczowe są albo pobierane przez tkankę tłuszczową, albo transportowane dalej przez albuminę surowicy krwi do wątroby.

LIPOPROTEINY o bardzo małej gęstości (VLDL) rozprowadzają po organizmie zsintetyzowane przez wątrobę lipidy. Czasteczki VLDL wskutek rozpadu stają się mniejsze przechodząc w LDL.

LIPOPROTEINY o dużej gęstości (HDL) są również wytwarzane w komórkach miąższowych wątroby. Zawierają stosunkowo dużo apoproteiny C III, która może zostać przeniesiona na chylomikrony lub VLDL. Odwrotnie czasteczki HDL mogą przejmować Apo-C od rozłożonych chylomikronów.

LIPOPROTEINY LDL są bogate w wolny cholesterol i jego estry. Estry cholesterolu powstają pod działaniem enzymu występującego w osoczu krwi i aktywowanego przez Apo-AI-acylotransferazę lecytyna : cholesterol (LCAT). Wiele komórek zawiera na swojej powierzchni receptory specyficzne w stosunku do Apo-B LDL. Wiążą one czastki LDL i przenoszą je do wnętrza komórki, gdzie te lipoproteiny są rozkładane przez lizosomy. Towarzyszy temu uwalnianie cholesterolu. Wolny cholesterol może działać jako receptor syntezy kluczowego enzymu biosyntezy cholesterolu; reduktazy 3-metyloglutarylo CoA.

Podwyższenie stężenia LDL (a tym samym stężenia cholesterolu) w osoczu krwi powodują wzmożone wchłanianie estrów cholesterolu przez komórki ścian naczyń krwionośnych. Gromadzenie się estrów cholesterolu prowadzi do zmian miażdżycowych.

BIALKA - KLASYFIKACJA

4.3.4. GLIKOPROTEINY

Glikoproteiny są to kompleksy WĘGLOWODANOWO-BIAŁKOWE, w których krótkie oligosacharydy przyłączone są wiązaniami glikozydowymi do łańcuchów bocznych niektórych aminokwasów. Istnieje kilka sposobów przyłączania oligosacharydów: np. wiązanie O-GLIKOZYDOWE (do Ser, Tre), N-GLIKOZYDOWE (do N-końcowych grup aminowych, grupy ε-aminowej Liz, azotu grupy amidowej Asn) oraz POŁĄCZENIA ESTROWE z udziałem tlenu glikozydowego (Glu, Asp). Składowe węglowodanowe zwykle zawierają heksozy (głównie D-galaktozę, D-mannozę i D-glukozę oraz N-acetyloheksoaminy, jak również L-fukozę lub kwas sialowy (kwas N-acetyloneuraminowy) jako końcowe elementy łańcuchów węglowodanowych. GLIKOPROTEINY występują jako składniki błon, enzymów, przeciwciał, substancji grupowych krwi, śluzów, czynników komplementarnych, hormonów i białek surowicy. Występują one we wszystkich frakcjach surowicy z wyjątkiem frakcji albumin.

Glikoproteiny spełniają szereg różnych funkcji. Na powierzchni komórek biorą aktywny udział w transporcie przez błony oraz działają jako białka przenoszące jony metali (Fe^{+3} , Cu^{+2}). Duża lepkość roztworów glikoprotein nadaje im właściwości smaru. Glikoproteiny wchodzi w skład substancji śluzowych w wydzielinach gruczołów, w płynach stawowych oraz tkance łącznej.

4.3.5. NUKLEOPROTEINY

Nukleoproteiny są KOMPLEKSAMI KWASÓW NUKLEINOWYCH I BIAŁEK. Składnikami białkowymi mogą być: protaminy, histony i białka niehistonowe chromosomów. W kompleksach tych jako kwas nukleinowy najczęściej występuje DNA. Nukleoproteiny odgrywają zasadniczą rolę w replikacji DNA i kontroli genetycznej oraz biosyntezie białka (rybosomy).

BIALKA - CHARAKTERYSTYKA FIZ. CHEM.

4.3.6. METALOPROTEINY

Jony niektórych metali mają zdolność wiązania się z białkami i tworzenia z nimi kompleksów. Wiele oksydaz np. OKSYDAZA FENOLOWA, OKSYDAZA CYTOCHROMOWA, OKSYDAZA ASKORBINIANOWA, zawiera MIEDZ. Z kolei jon Mn^{+2} , występuje w KARBOKSYLAZIE PIROGRONIANOWEJ mitochondriów, działa jako specyficzny aktywator SYNTETAZY GLUTAMINOWEJ (z *Escherichia coli*). MANGAN zawiera także tkankowe enzymy glikolityczne i proteolityczne. ANHYDRAZA WĘGLANOWA jest przykładem enzymu zawierającego CYNK. FERRYTYNA i HEMOSYDERYNA - są białkami, które przechowują ŻELAZO. Wiąże one w sumie 25% żelaza zawartego w całym organizmie. Pozbawiona żelaza ferrytyna-APOFERRYTYNA ma kształt płytki i składa się z 24 podjednostek. Żelazo występuje w ferrytynie w postaci wodorotlenków i tlenków tworzących micle, z których w każdej może znajdować się 4300 jonów Fe^{+3} . W taki sposób nadmiar żelaza w organizmie jest przechowywany wewnątrz komórki i w razie potrzeby uwalniany.

4.4. CHARAKTERYSTYKA FIZYKOCHEMICZNA BIAŁEK

4.4.1. CHARAKTER AMFOTERYCZNY

Podobnie jak aminokwasy, białka także są elektrolitami amfoterycznymi. W cząsteczce białka grupami zdolnymi do jonizacji są grupy COOH -aminokwasów dwukarboksylowych (kwasowych), grupy NH_2 aminokwasów dwuaminowych (zasadowych), nieznaczna ilość końcowych grup aminowych i karboksylowych, grupa OH-TYROZINY, -SH-CYSTEINY, reszta IMIDAZOLOWA HISTYDINY, GUANIDYNOWA ARGININY oraz reszty FOSFORANOWE FOSFOPROTEIN. Obecność powyższych grup nadaje cząsteczce białka charakter wielowartościowego jonu, czyli wieloelektrolitu. Zarówno dysocjacja grup karboksylowych, jak i przyłączanie jonów wodorowych (H^+) do grup aminowych związanych z białkiem zależą od pH roztworu. Podobnie do aminokwasów, dla białek również istnieje pojęcie punktu izoelektrycznego (pI ; pH_1). Cząsteczka białkowa w pI staje się dipolem o bardzo dużym momencie dipolowym z powodu nierównomiernego rozmieszczenia grup aminowych i karboksylowych. Ta dwubiegunowa struktura ma duże znacze-

BIALKO - CHARAKTERYSTYKA FIZ. CHEM.

nie dla wzajemnego oddziaływania pomiędzy cząsteczkami białkowymi i innymi jonami lub cząsteczkami. Dla wartości pH mniejszych od pI cząsteczka białka nabiera charakteru coraz silniej zjonizowanego kwasu wielokationowego. W roztworach o pH większych od pI cząsteczka białka staje się silnie zjonizowana zasada wieloaminowa. Przy wysokim pH wszystkie grupy karboksylowe są zdysocjowane, a grupy aminowe są nie-naładowane, przy niskim pH sytuacja jest odwrotna: cofnięta jest dysocjacja grup karboksylowych, a grupy aminowe występują w postaci jonów aminowych NH_3^+ . Ładunek cząsteczki białka zależy więc od stężenia jonów wodorowych. Ze zmianą pH zmienia się jego wartość, a nawet znak (przy przekroczeniu punktu izoelektrycznego). Cząsteczki białka znajdujące się w roztworze o pH różnym od jego pI mają tym większy ładunek elektryczny, im większa jest różnica pomiędzy wartościami pH i pI. Jeżeli w roztworze będzie nie jedno białko, lecz mieszanina białek o różnych pI, to ich cząsteczki w zależności od różnic między wartościami pI i w zależności od pH roztworu będą mogły mieć mniejsze lub większe ładunki elektryczne albo nie mieć ich wcale. Jedne cząsteczki mogą być naładowane ujemnie a inne dodatnio. Cząsteczki białek takiej mieszaniny umieszczone w polu elektrycznym będą przyciągane w stronę elektrod o przeciwnych znakach. Beładna mieszanina cząsteczek ulegnie uporządkowaniu i rozdzieleniu, ponieważ szybkość poruszania się cząsteczek poszczególnych białek będzie różna z powodu różnic w wielkościach ładunku elektrycznego. Szybkość wędrówki rozdzielonych cząsteczek białka zależy też od ich masy cząsteczkowej i kształtu, oraz natężenia prądu przyłożonego do elektrod.

Opisane zjawisko nosi nazwę **ELEKTROFOREZY** i wykorzystywane jest do rozdziału mieszaniny białek.

4.4.2. ROZPUSSCZALNOŚĆ

Rozpuszczalność jakiegokolwiek substancji jest wynikiem zrównoważenia wewnętrznych sił przyciągania cząsteczek ciała rozpuszczanego i przyciągania między cząsteczkami rozpuszczalnika, a cząsteczkami ciała rozpuszczanego.

Rozpuszczalność białek zależy od szeregu czynników takich jak: pH, rodzaj rozpuszczalnika, stężenie elektrolitu (siła jonowa) oraz typu

BIĄŁKA - CHARAKTERYSTYKA FIZ. CHEM.

jonów w środowisku. Ważną rolę odgrywa także charakter białka i jego cechy strukturalne: białka globularne i fibrylarne. O rozpuszczalności białek decyduje przede wszystkim ich POWINOWACTWO DO WODY (zdolność do hydratacji). Przez hydratację należy rozumieć wiązanie się dipoli wody z grupami polarnymi białka, dzięki czemu cząsteczka białka otacza się płaszczem wodnym. Ilość wody hydratacyjnej związanej przez białko może sięgać 0,3 - 0,4g wody na 1g białka. Hydrofilowe grupy łańcuchów bocznych aminokwasów wykazują różne powinowactwo do wody, wg którego można je uporządkować następująco: $-COOH$ $-OH$ $-NH_2$ $=NH$ $-SH$ oraz atomy N i O wiązania peptydowego. Teoretycznie grupy: $=CO$ i $=NH$ powinny wiązać koordynacyjnie po 2 cząsteczki H_2O , w rzeczywistości wiąza tylko połowę tej ilości, a spowodowane jest to ukształtowaniem przestrzennym ich sąsiedztwa. Natomiast grupy polarne łańcuchów bocznych nie podlegając takim ograniczeniom przestrzennym są uwodnione maksymalnie. Cząsteczka wody połączona jest z grupami hydrofilowymi wiązaniem wodorowym.

TEORETYCZNA LICZBA CZĄSTECZEK H_2O WIĄZANYCH PRZEZ
GRUPY FUNKCYJNE AMINOKWASÓW

GRUPA FUNKCYJNA	-OH	-COOH	-O-	-NH ₂	=NH	=N-	-SH
Liczba cząsteczek H_2O	3	4	2	3	2	1	1

Białko rozpuszczane w niewielkiej ilości wody wchłania ją i tworzy galaretowaty żel, w którego wewnętrznych przestrzeniach gromadzą się cząsteczki H_2O . Towarzyszy temu zwiększenie się odległości między poszczególnymi cząsteczkami białka powodujące zwiększenie się objętości zwane PECZNIECIEM BIAŁKA. Uwodnienie i pęcznienie są wspólną właściwością białek rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych, ale tylko te pierwsze ulegają rozprowadzeniu, tworząc hydrofilowe roztwory koloidowe. Powinowactwo do wody nie przesądza sprawy rozpuszczalności, np. kola-

BIALKO - CHARAKTERYSTYKA FIZ. CHEM.

gen, wykazujący znacznie większe powinowactwo do wody niż albumina jest nierozpuszczalny w wodzie, natomiast albumina rozpuszcza się łatwo. Niewielkie stężenia soli nieorganicznych wpływają dodatnio na rozpuszczalność białek. Liczne białka nierozpuszczalne w wodzie, rozpuszczają się dopiero w rozcieńczonych roztworach soli. Ten efekt spowodowany jest zubożeniem przez jony soli zjonizowanych grup białka odpowiedzialnych za przyciąganie między cząsteczkami białek.

Białka są AMFOTERYCZNYMI WIELOELEKTROLITAMI stąd pH roztworu, zmieniając ionizację grup funkcyjnych łańcuchów bocznych, wpływa również na ich rozpuszczalność. Rozpuszczalność białka w PUNKCIE IZOELEKTRYCZNYM jest najmniejsza, gdyż w tym punkcie przyciąganie między cząsteczkami białka jest największe.

W pH różnym od pI cząsteczki białka mają ładunek, co zmniejsza wzajemne przyciąganie się cząsteczek, a w następstwie zwiększa ich rozpuszczalność.

4.4.3. WYSALANIE

Korzystny wpływ jonów soli na rozpuszczalność białek ustaje, gdy wzrasta stężenie soli. Białka rozpuszczalne w wodzie można wytrącić z roztworu dużym stężeniem soli. Proces ten nazywa się WYSALANIEM BIAŁKA. Do wysalania białek używa się soli, których jony łatwo tworzą wodziany. Sole mające możliwość wiązania wody konkurując z białkiem o cząsteczki H_2O , odbierają cząsteczkom białka "płaszcz wodny", co z kolei obniża ich rozpuszczalność i prowadzi do wypadania z roztworu. Stężenie soli potrzebne do wysolenia białka zależy od właściwości danego białka i od pH środowiska. Białko najłatwiej jest wysolic w punkcie izoelektrycznym, gdyż brak ładunków elektrycznych sprzyja łączeniu się cząsteczek w większe agregaty, łatwo wypadające z roztworu. Najczęściej do wysalania stosuje się SIARCZAN ANONOWY, CHLOREK SODOWY lub SIARCZAN MAGNEZOWY. Wysalanie białek jest procesem ODWRACALNYM Po obniżeniu stężenia soli np. przez dializę, można z powrotem rozpuścić wytrącone białko. Wykazuje ono wówczas swoje natywne właściwości, ponieważ wysalanie nie wywołuje uszkodzenia struktury.

BIALKA - CHARAKTERYSTYKA FIZ. CHEM.

4.4.4 DENATURACJA

Denaturacja białka nazywamy takie zmiany w strukturze, które prowadzi do utraty aktywności biologicznej lub innej indywidualnej cechy charakterystycznej tego białka. Podczas denaturacji przede wszystkim są niszczone **WIAZANIA WODOROWE**. W obecności odczynników redukujących rozszczepieniu ulegają **WIAZANIA DISULFIDOWE**. Pojawiają się wówczas wolne grupy $-SH$. W wyniku rozerwania wiązań stabilizujących strukturę białka, łańcuchy peptydowe przyjmują w przestrzeni inną pozycję, a uwolnione grupy funkcyjne aminokwasów mogą tworzyć inne, nowe wiązania. Zmienia to oczywiście konfigurację przestrzenną cząsteczki. Taka **ZDENATUROWANA** cząsteczka białka odznacza się zawsze zmianą, a nawet utratą właściwości biologicznych (enzymatycznych, antygenowych, hormonalnych).

Nieodwracalny na ogół proces denaturacji może w pewnych wypadkach ulec cofnięciu, gdy np. czynnik denaturacyjny działał stosunkowo krótko i nie spowodował daleko posuniętych zmian w strukturze.

Denaturację białka wywołują niektóre czynniki fizyczne takie jak: OGRZEWANIE, ULTRADZWIEKI, PROMIENIOWANIE KRÓTKOFALOWE i JONIZUJĄCE, WSTRZASANIE WODNYCH roztworów białka w atmosferze powietrza. Do chemicznych czynników denaturujących należą: KWASY, ZASADY, JONY METALI CIĘŻKICH, ORGANICZNE ANiony, MOCZNIK, AMIDY KWASOWE, DETERGENTY, FENOL, CHLOROFORM, rozpuszczalniki mieszające się z wodą, jak ALKOHOL, ACETON itp.

4.4.5. MASA CZĄSTECZKOWA

Masa cząsteczkowa białek waha się w szerokich granicach od kilkunastu do kilkuset tysięcy.

Do określenia masy cząsteczkowej i kształtu cząsteczek białkowych stosuje się wiele metod fizykochemicznych obejmujących POMIARY LEPKOŚCI, oznaczania SZYBKOSCI DYFUZJI i SEDYMENTACJI w ultrawirówce, określanie RUCHLIWOŚCI ELEKTROFORETYCZNEJ i CHROMATOGRAFICZNEJ oraz pomiary ROZPRASZANIA ŚWIATŁA i CIŚNIENIA OSMOTYCZNEGO.

Ostatnio najczęściej stosowanymi są metody z użyciem ultrawirówki

oraz chromatografii: pomiar szybkości sedymentacji oraz metoda równowagi sedymentacyjnej. W metodzie opartej na pomiarze szybkości sedymentacji konieczne jest wytworzenie takiego pola grawitacyjnego, które zapewniłoby całkowite osadzanie się (sedymentację) badanej substancji. Szybkość sedymentacji białka jest wprost proporcjonalna do jego masy cząsteczkowej.

W celu wykonania pomiaru współczynnika sedymentacji i co jest z tym związane masy cząsteczkowej białka, roztwór białka umieszcza się w polu grawitacyjnym 500 tys. razy silniejszym od przyciągania ziemskiego (uzyskuje się go w ultrawirówkach przy szybkości ok. 70000 obr/min). Przy określaniu masy cząsteczkowej metodą równowagi sedymentacyjnej białko wiruje się dodatkowo w gradiencie gęstości sacharozy, bądź chlorku cezu i porównuje po ustaleniu równowagi z odpowiednim stężeniem w gradiencie.

Masę cząsteczkową białka można również określić metodą FILTRACJI ŻELOWEJ (chromatografia sitowa = molekularna = żelowa = saczenie molekularne = saczenie przez sита molekularne) przy użyciu usieciowanych polisacharydów - typu SEPHADEX (G-50, G-100, G-200) oraz POLIAKRYLOAMIDÓW (Bio-Gel P-100, P-150, P-300). Chromatografię tego typu można przeprowadzić metodą kolumnową lub cienkowarstwową. Szybkość dyfuzji cząsteczek białka w żelu zależy od wielkości porów tego żelu i rozmiarów cząsteczki białka (jego masy cząsteczkowej). Duże białka trudno unikają w pory sita, natomiast małe łatwiej i stąd duże białka są eluowane przed mniejszymi. Porównując profile elucji białek wzorcowych z profilem elucji badanego białka można z dużym przybliżeniem określić jego masę cząsteczkową. Chromatografia cienko-warstwowa przebiega podobnie, a ponadto ma tę zaletę, że nie wymaga dużych ilości materiału badanego.

Podobne możliwości stwarza METODA ELEKTROFOREZY w żelu poliakryloamidowym ponieważ zachodzi frakcjonowanie cząsteczek zgodnie z ich wielkością i ładunkiem.

4.4.6. BIAŁKA OSOCZA

W ludzkim osoczu znamy obecnie ponad 200 różnych białek, z których ok. 70 zostało wyizolowanych w stanie czystym i dość dokładnie

BIALKO OSOCZA

scharakteryzowanych. Stanowią one główną część stałych składników osocza, występując w stężeniu średnio 75 g/dm^3 . Większość białek osocza pełni funkcje **TRANSPORTOWE** przenosząc różne składniki odżywcze, witaminy, hormony, jony metali, kwasy tłuszczowe, leki itp. Inne natomiast białka mają **AKTYWNOŚĆ PRZECIWCIAL** biorą udział w krzepnięciu krwi, utrzymują ciśnienie osmotyczne oraz pełnią inne swoiste funkcje. Białka te wykazują ogromną różnorodność wielkości i kształtu cząsteczek, ładunku elektrycznego, rozpuszczalności, szybkości sedymentacji w ultrawirówce itd.

Białka osocza są przeważnie **GLIKOPROTEINAMI** i wykazują znaczny polimorfizm genetyczny. Obecnie znanych jest ponad 100 genetycznie uwarunkowanych odmian poszczególnych białek osoczkowych występujących w różnych stanach patologicznych. Tabela zawiera zestawienie prawidłowych białek osocza oraz ich funkcje.

ZESTAWIENIE BIAŁEK WYSTĘPUJĄCYCH W OSOCZU LUDZKIM

(CYT. za W. Ostrowski, M. Gumińska, A. Krawczyk; Ćwiczenia z chemii ogólnej i fizjologicznej, PZWL, Warszawa 1986 str. 476)

BIALKO	CECHY CHARAKTERYSTYCZNE I ROLA W ORGANIZMIE
PREALBUMINA	Transport tyroksyny i witaminy A. ZMNIEJSZA się w chorobach wątroby. WZROST w nerczycach.
ALBUMINA	Biologiczny okres półtrwania 7-27 dni. Wiąże i transportuje wodę, Ca^{2+} , Mg^{2+} , bilirubinę, kwasy tłuszczowe, progesteron, leki (antybiotyki, barbiturany, glikozydy nasercowe) Znalezione 8 autosomalnych genetycznych wariantów. W bis-albuminemiach opisano 2 frakcje albuminowe. SPADEK stężenia w chorobach nerek, wątroby, w nowotworach, w głodzie i w zespołach upośledzonego wchłaniania.

BIALKA OSOCZA

GLOBULINY α_1

α_1 -Antytrypsyna

Hamuje trypsynę i inne proteazy (90%) **ZWIEKSZA** się w zapaleniach i martwicach tkanekowych. **Brak** (recesywny, autosomalny) u homozygot prowadzi do schorzeń oskrzelowo - płucnych. **ZAHAMOWANIE** proteaz leukocytarnych prowadzi do wzrostu podatności na zakażenia. **BRAK** w marskości wątroby i w schyłkach zastoinowych.

α_1 -Glikoproteina

(seromukoid =
orozomukoid)

Zawiera ok. 40% cukru (12% kwasu siłowego). Wiąże niektóre steroidy (progesteron, testosteron). Nie jest wytrącana przez PCA lub TCA. **ZWIEKSZA** się w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych, po operacjach w nowotworach złotkliwych. **ZMNIEJSZA** się w marskości wątroby.

Protrombina

Jest proenzymem trombiny. **NIEZBEDNA** w krzepnięciu krwi. Jest glikoproteina. **ZMNIEJSZA** się w chorobach wątroby.

Transkortyna

Glikoproteina. Transport kortyzolu.

Białka wiążące

Glikoproteina. Transport tyroksyny.

tyroksyne

α_1 -Antychymo-

trypsyna

Glikoproteina. Inhibitor chymotrypsyny

α_1 -Lipoproteina

Lipoproteina o wysokiej gęstości (HDL). Transport fosfolipidów i hormonów. **ZMNIEJSZA** się w chorobach wątroby

BIALKA OSOCZA

Gc-Globulina Glikoproteina. **ZNIEJSZA** się w chorobach wątroby.
(Składnik grupowy) **WZROST** w ciąży.
Typy: Gc 1-1 (45%), Gc 2-2 (30%), Gc 2-1 (7%),
Gc-X, Gc-Y

GLOBULINY α_2 Ceruloplazmina

Cu^{2+} -0,32%, 8 atomów Cu/mol białka. Barwa niebieska.
Aktywność oksydazy. Glikoproteina. U noworodków
częsty brak. **ZNIEJSZA** się w ciąży, w ostrych zapaleniach, w żółtaczkach zastoinowych, w nowotworach, w reumatyzmie. **ZNIEJSZA** się w degeneracji soczewkowo-wątrobowej (choroba Wilsona), w marskości wątroby, w chronicznym zapaleniu wątroby i w chorobach krążenia.

Haptoglobiny Typy: Hp 1-1, Hp 2-2, Hp 2-1. Wiążą hemoglobinę i transportują do USS. Mieloglobina nie jest wiązana. W połączeniu z Hb - aktywność pseudoperoksydazowa. Glikoproteina. **ZNIEJSZA** się w uszkodzeniu wątroby i w niedokrwistości hemolitycznej. Małe wartości u noworodków. **ZNIEJSZA** się w ostrych stanach zapalnych, w nowotworach, w cukrzycy.

α_2 -Makroglobulina Duża zawartość cukru (8-11%) i cynku. Inhibitor proteaz. Synteza posawątrobowa. **WZROST** w marskości wątroby, w nerzycy, w obrzęku śluzowatym, w cukrzycy. **BRAK ZMIAN** podczas ostrych stanów zapalnych. **ZNIEJSZENIE** w paraproteinemiach i w reumatyzmie.

BIAŁKA OSOCZA

α_2 -Antytrombina	Glikoproteina. Inhibitor trombiny. ZNIEJSZA się w chorobach wątroby, w wewnątrznaczyniowych zakrzepach.
C 1s-Komponent	Aktywność esterazy, składnik komplementu.
C 9-Komponent	Składnik komplementu. Glikoproteina.
C 1-Inhibitor	Inhibitor esterazy (Składnika C1s). Glikoproteina.
p-Cholinoesteraza	Aktywność cholinoesterazy. Glikoproteina.
Plazminogen (profibrynolizyna)	Glikoproteina. Proenzym fibrynolizy. Zmniejsza się podczas silnej fibrynolizy.

GLOBULINY β

Transferyna (syderyofilina)	Glikoproteina o barwie czerwonej. Transportuje 2 atomy żelaza (Fe^{+3}) na mol białka. Normalnie tylko 1/3 transferyny jest wysycana żelazem. ZNIEJSZA się w nerzycy, w uszkodzeniu wątroby, w nowotworach, w niedokrwistości hipochromicznej.
Hemopeksyna	Zawartość cukru ok. 23%. Nie wytrąca się PCA, TCA ani SSA. Wiąże hem, porfiryne i zawierające hem hemo-proteiny. Rozkłada się w wątrobie. Chroni przed utratą żelaza z moczem. ZNIEJSZA się podczas hemolizy, w chorobach wątroby, w porfiriach, w zespole nerzycowym, w enteropatiach wysiękowych. ZNIEJSZA się w zapaleniach i nowotworach.

Białko wiążące steroidy	Zawartość cukru 12,6%. Tetramer. Wiąże testosteron, estradiol i 17-hydroksysteroidy. WZROST w nowotworach i marskości wątroby.
Składniki komplementu: C-2, C-3, C-4, C-5, C-1 _q (11S), C-8	Glikoproteiny. ZMIEJSZAJĄ się w chorobach autoimmunizacyjnych (zapalenie kłębuszków nerkowych, toczeń rumieniowaty).
β -Lipoproteiny LDL	Transportują lipidy, cholesterol (hormony). ZWIEKSZENIE w nerzycach. BRAK w alipoproteinemii.
Fibrynogen	Glikoproteina. ZMIEJSZA się w chorobach wątroby, w nadmiernej fibrylizacji. ZWIEKSZA się w zawałach, w zapaleniach płuc, w nowotworach, w kolagenozach, w żółtaczce zastoinowej.
γ-Globuliny	(Występują nie tylko we frakcji γ -globulinowej).
Immunoglobuliny	Białka o funkcji ciał odpornościowych.
IgG	Biologiczny okres półtrwania 21 dni. Łańcuchy H: γ_2, γ_2 L: X_2, X_2 .
IgA	Biologiczny okres półtrwania 5,8 dni. Łańcuchy H: α_2, α_2 L: X_2, X_2 .
IgM	Biologiczny okres półtrwania 5,1 dni. Łańcuchy H: μ_2, μ_2 L: X_2, X_2 .
IgD	Biologiczny okres półtrwania 2,8 dni. Łańcuchy H: δ_2, δ_2 L: X_2, λ_2 .

BIALKA OSOCZA

- IgE** Biologiczny okres półtrwania 2,3 dni. Łańcuchy H: ϵ_2, δ_2 . L: χ_2, λ_2
- Łańcuchy H:** ($\gamma, \alpha, \mu, \delta, \epsilon$) Podtypy: 1,2,3,4.
Dwa łańcuchy H na mol białka (wyj. IgM: 2Hx5).
- Łańcuchy L:** (χ, λ) 211-221 aminokwasów/łańcuch. Dwa łańcuchy L na mol białka (wyj. IgM: 2L x 5). Hiperimmunoglobulinemia: Ostre i przewlekłe procesy zapalne.
- ZWIEKSZENIE** IgG w zapaleniu wątroby. IgA - w marskości wątroby, w zapaleniu trzustki. IgM - przewlekłe zapalenie wątroby, mononukleozę zakaźną. Choroby autoimmunizacyjne. Choroby alergiczne: IgE - w astmie oskrzelowej. Odkłada się na bazofilach i uwalnia histaminę. W chorobach pasożytniczych (IgE lub IgM). W paraproteinemiach. **ZMNIJSZENIE** zespoły niedoboru przeciwciał: wady limfocytów B. Nowotwory USS, po napromieniowaniu, po środkach immunosupresyjnych. Po aglutynii anty-IgG. Pierwotne wady limfocytów B: Choroba Brutona α - γ -globulinemia.
- Zespoły upośledzonej syntezy IgG. Zespół Wiskotta-Aldricha - osłabienie, spadek IgG i wzrost IgA. (Defekt limfocytów B i T). Zespół Louisa-Barra - brak IgA i IgE.

Paraproteiny:

- (typ immunoglobulin)
1. Plasmocytoma (myeloma). Rozpłen komórek plazmatycznych

Typy: IgG, IgA, IgD i IgE-plasmocytowych.

BIĄŁKA OSOCZA

2. Makroglobulinemia Waldenstroma. Monoklonalny roz-
płen komórek tworzących IgM.
3. Choroba łańcuchów lekkich (L) (plazmocytoza L).
Białko Bence-Jonesa.
4. Choroba łańcuchów ciężkich (H). Zespół Franklina
5. Krioglobulinemia: Immunoglobulinemia anty -IgM.
Mała rozpuszczalność białka poniżej 37 °C. Wzrost
lepkości osocza. W przewlekłych zakażeniach, w
chorobach autoimmunizacyjnych, w nowotworach.

Białko C-reaktywne	Powstaje w USS. Tworzy osad z polisacharydem typu C z pneumokoka w obecności Ca^{2+} . Występuje w zapale- niach i zakażeniach
Dopełniacz	Układ złożony z 11 białek surowicy : C1q, C1r, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C1s, a także aktywa- torów i inhibitorów. Aktywowany przez kompleksy antygenu z przeciwciałem w reakcji łańcuchowej: C1-C4-C2-C3-C5-C6-C7-C8-C9. Potem wiązanie C1q do przeciwciała . Aktywacja C1s przez C1r na esterazę, której substratem jest C2 i C4. Aktywacja błon i udział w hemolisie i fagocy- tozie. ZWIĘKSZENIE w zapaleniach lub różnych ge- netycznych defektach poszczególnych składników.
α_1 -Fetulina (Fetoproteina)	Tworzy się w wątrobie płodowej. PRZĘSNIOWE ZWIĘKSZENIE w ciąży. WYRAŻNE ZWIĘKSZENIE w pierwotnych nowotworach wątroby, w teratomach i teratoblastomach. Ma znaczenie dla diagnostyki tego typu nowotworów i dla kontroli terapii.

BIALKA - ĆWICZENIA

Antygen karcyno- Glikoproteina z frakcji β . Pochodzi z wielu nowo-
embrionalny tworów i tkanek płodowych. **WZRÓST** w nowotworach
przewodu pokarmowego. Małe znaczenie diagnostyczne,
natomiast ważny dla kontroli terapii operacyj-
nej i pojawiania się przerzutów.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA



9

WYSALANIE BIAŁEK

WYKONANIE:

Do 12 probówek oznaczonych numerami 1-12 wlać:

Do probówki 1-3 wlać po 2 cm³ roztworu śluziny

" " 4-6 " " " " albuminy

" " 7-9 " " " " globuliny

" " 10-12 " " " " białka jaja kurzego

Następnie do probówki: 1,4,7,10 dodać po 8 cm³ H₂O

2,5,8,11 " po 3 cm³ H₂O oraz po 5 cm³

nasyconego roztworu (NH₄)₂SO₄

3,6,9,12 " po 8 cm³ nasyconego roztworu
(NH₄)₂SO₄

Zmętnienie świadczy o wysalaniu się białka. Wynik zapisać w zeszycie.

BIAŁKA - ĆWICZENIA

NR. PROBÓWKI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,8% roztwór żelatyny	2	2	2									
1% roztwór albuminy				2	2	2						
1% roztwór globuliny							2	2	2			
1% roztwór białka jaja kurzego										2	2	2
woda	8	3		8	3		8	3		8	3	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nasycony		5	8		5	8		5	8		5	8
WYNIKI												

Cyfry: 2,3,5,8 w tabelce oznaczają ilość dodanych cm^3 odczynników lub wody.



10

OZNACZANIE PUNKTU IZOELEKTRYCZNEGO KAZEINY

ZASADA: Oparta jest na najmniejszej rozpuszczalności kazeiny w punkcie izoelektrycznym. Przez odpowiedni dobór stężeń kwasu octowego i octanu sodu przygotowuje się szereg probówek z roztworami o różnych wartościach pH i dodaje do nich jednakową ilość kazeiny. Wartość pH w probówce, w której wystąpi najobfitszy osad, odpowiada pH_i kazeiny.

BIAŁKA - ĆWICZENIA

WYKONANIE: Przygotować 9 suchych probówek. Do pierwszej odmierzyć $3,2 \text{ cm}^3$ $1 \text{ N CH}_3\text{COOH}$ i $6,8 \text{ cm}^3$ wody, a do następnych ośmiu – po 5 cm^3 wody. Po dokładnym wymieszaniu zawartości w probówce pierwszej, przenieść z niej 5 cm^3 do drugiej, a z tej po wymieszaniu 5 cm^3 do trzeciej, z ostatniej 5 cm^3 wylać do zlewu. Do każdej probówki dodać po 1 cm^3 roztworu kazeiny w $0,1 \text{ N}$ roztworze octanu sodowego i wymieszać. Obserwować roztwory natychmiast po wymieszaniu i po 30 minutach. Wynik wpisać do poniższej tabelki:

NR. PROBÓWKI	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Liczba cm^3 $1 \text{ N CH}_3\text{COOH}$	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,012	0,006
pH roztworu	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	5,0	5,3	5,6	5,9
Zmętnienie									
Osad									



11

ODDZIELANIE ALBUMIN OD GLOBULIN SIARCZANEM AMONU

WYKONANIE: Do 2 cm^3 surowicy dodać 2 cm^3 nasyconego roztworu siarczanu amonu i wymieszać. Wytrąca się osad globulin. Przesączyć, a do przesączu dodać sproszkowanego $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aż do nasycenia roztworu. Wytrącają się albuminy. Przesączyć, w otrzymanym płynie wykonać reakcję biurelową.

Globuliny wysalają się przy połowicznym stopniu nasycenia siarczanem amonu, albuminy zaś przy całkowitym nasyceniu.

BIAŁKA - ĆWICZENIA



12

ODDZIELANIE ALBUMIN OD GLOBULIN SIARCZANEM MAGNEZU I SIARCZANEM AMONU

WYKONANIE: Do 2 cm³ surowicy dodać sproszkowanego MgSO₄ aż do całkowitego nasycenia. Wytrącają się globuliny. Przesączyć, a w przesączu wytrącić albuminy siarczanem amonu jak w doświadczeniu powyżej.

Globuliny wytrącają się siarczanem magnezu dopiero przy całkowitym nasyceniu.



13

DENATURACJA BIAŁKA

WYKONANIE: Do trzech probówek wlać po 2-3 cm³ 5% klarownego roztworu białka. Zawartość pierwszej probówki zagotować. Do drugiej dodać 10 kropeł kwasu trójchlorooctowego. Zawartość trzeciej probówki podwarstwić 1 cm³ octanu ołowianego, tak aby płyny nie zmieszały się. Osad, zmętnienie, biały pierścień świadczą o dodatnim wyniku reakcji. W probówce pierwszej denaturacja nastąpiła pod wpływem podwyższonej temperatury, w drugiej pod wpływem mocnego kwasu, a w trzeciej pod wpływem soli metalu ciężkiego.



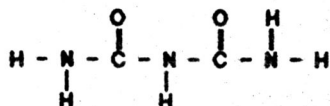
14

REAKCJA BIURETOWA PIOTROWSKIEGO

ZASADA: Reakcja biuretowa jest charakterystyczna dla związków z co

najmniej dwoma wiązaniami: PEPTYDOWYMI $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\ \parallel \quad | \\ -\text{C}-\text{N}- \end{array}$

Jednym z najprostrzych związków tego typu jest **BIURET** (dwumocznik):



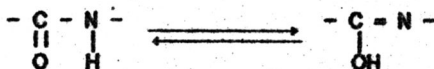
Od nazwy tego związku wywodzi się
nazwa reakcji Piotrowskiego

Odczyn biuretowy daje:

co najmniej z trzech amin-

BIALKA - ĆWICZENIA

kwasów. Reakcja ta polega na tworzeniu barwnego kompleksu z jonami miedziowymi w środowisku zasadowym. W środowisku tym zachodzi tautomerizacja ugrupowania przy wiązaniu peptydowym, z utworzeniem formy enolowej, w której grupa hydroksylowa zdolna jest do dysocjacji.



Z sąsiadującymi ze sobą wiązaniami tego typu jon miedziowy tworzy dwa wiązania jonowe (z grupami enolowymi) oraz cztery wiązania koordynacyjne (z atomami azotu). Stężenie powstającego kompleksu barwnego jest proporcjonalne do liczby wiązań peptydowych związków zawartych w badanym roztworze. Liczba zaś wiązań peptydowych jest proporcjonalna do ilości białka.

WYKONANIE Do trzech probówek wlać po 1 cm^3 roztworu glicyny, insuliny i białka jaja kurzego. Do każdej dodać po 1 cm^3 10 % roztworu NaOH, następnie 4-5 kropel 1 % roztworu CuSO_4 . Reakcja jest dodatnia w wypadku pojawienia się zabarwienia czerwono-fioletowego. Nadmiar CuSO_4 maskuje wynik reakcji.

BIALKA - ĆWICZENIA

PRZYGOTOWANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ

WYKONANIE: Sporządzić rozcieńczone roztwory wzorcowe o stężeniach od 1 mg/cm^3 do 10 mg/cm^3 , przez kolejne rozcieńczenie roztworu macierzystego $0,9\%$ roztworem NaCl. Do kolejnych probówek odpipetować po 4 cm^3 $0,9\%$ NaCl, po wymieszaniu dodać po 5 cm^3 odczynnika biuretowego. Zawartość probówek wymieszać i po 20 minutach oznaczyć absorbancję przy długości fali 525 nm wobec próby ślepej (5 cm^3 $0,9\%$ NaCl + 5 cm^3 odczynnika biuretowego). Sporządzić wykres, na którym na osi rzędnych odłożyć wartość absorbancji, a na osi odciętych stężenie badanego białka.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA O NIEZNANYM STĘŻENIU

WYKONANIE: Do jednej probówki nalać 5 cm^3 $0,9\%$ roztworu NaCl i 5 cm^3 odczynnika biuretowego - próba ślepa. Do drugiej probówki wlać 1 cm^3 badanego białka i 4 cm^3 $0,9\%$ NaCl. Po wymieszaniu dodać 5 cm^3 odczynnika biuretowego. Wymieszać zawartość obu probówek i po 20 minutach oznaczyć absorbancję w próbce zawierającej badane białko w stosunku do ślepej próby przy długości fali 525 nm . Stężenie białka odczytać z krzywej wzorcowej.



16

OZNACZANIE STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ LOWRY'EGO

ZASADA: Metoda ta jest kombinacją reakcji biuretowej z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a. Reakcja przebiega w 2 etapach. Pierwszy polega na przyłączeniu jonów miedzi do wiązań peptydowych w łańcuchach peptydowych, co w konsekwencji prowadzi do powstania reakcji biuretowej. W drugim etapie następuje redukcja kwasu fosforowolframowego i fosfomolibdenowego do odpowiednich tlenków przez miedź związaną z białkiem oraz zachodzi reakcja miedzy odczynnikiem Folina a tyrozyna tryptofanem. Absorbancję powstałego zabarwienia odczytuje się przy 750 nm . Redukcja kwasu fosfomolibdenowego do tlenków molibdenowych zachodzi szybko w środowisku o pH około 10, jednocześnie przy tym pH kwas fosfomolibdenowy jest niestrawny i łatwo ulega hydrolizie do kwasu

BIALKA - ĆWICZENIA

fosforowego i molibdenowego. Aby temu zapobiec należy, po dodaniu odczynnika Folina, badać próbę natychmiast wymieszać.

Metoda Lowry'ego pozwala na oznaczanie białka już o stężeniu $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$

Jest to metoda około 100 razy czulsza od metody biuretowej.

ODCZYNNIKI

1. ODCZYNNIK A - 2% roztwór Na_2CO_3 w 0,1 M roztworze NaOH
2. ODCZYNNIK B_1 i B_2 : B_1 - 1% roztwór CuSO_4
 B_2 - 2% roztwór winianu sodowo-potasowego
3. ODCZYNNIK C - zasadowy roztwór miedzi. Zmieszać $0,5 \text{ cm}^3$ odczynnika B_1 , $0,5 \text{ cm}^3$ odczynnika B_2 oraz 50 cm^3 odczynnika A. (Odczynnik C przygotować na 30 min przed oznaczeniem).
4. ODCZYNNIK D - rozcieńczony do stężenia 1 M kwasu roztwór odczynnika Folina-Ciocalteu'a.
5. MACIERZYSTY WZORCOWY ROZTWÓR BIAŁKA zawierający $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

KRZYWA WZORCOWA

WYKONANIE: Przygotować 11 ponumerowanych kolejno próbek. Do 1 dodać 1 cm^3 0,9% roztworu NaCl, do drugiej $0,1 \text{ cm}^3$ macierzystego roztworu białka, do trzeciej $0,2 \text{ cm}^3$, do czwartej $0,3 \text{ cm}^3$ itd. We wszystkich próbkach objętość uzupełnić do 1 cm^3 0,9% roztworem NaCl. Do wszystkich próbek dodać 5 cm^3 odczynnika C. Po dokładnym wymieszaniu zawartość probówki pozostawić w temp. pokojowej na 10 minut. Następnie, przy natychmiastowym energicznym mieszaniu, dodać $0,5 \text{ cm}^3$ odczynnika D. Po upływie 30 min. odczytać w fotokolorymetrze wartość absorbancji przy 750 nm wobec ślepej próby. Wykreślić krzywą wzorcową odkładając na oś odciętych stężenie białka, na oś rzędnych absorbancję.

BIALKA - ĆWICZENIA

OZNACZENIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA O NIEZNANYM STEŻENIU

WYKONANIE: Do 1 probówki nalać 1 cm^3 0,9% NaCl i 5 cm^3 odczynnika C -próba ślepa. Do drugiej probówki wlać 1 cm^3 roztworu badanego białka i 5 cm^3 odczynnika C. Zawartość probówek wymieszać i odstawić na 10 min. Po tym czasie dodać do obu probówek po $0,5\text{ cm}^3$ odczynnika D. Zawartość probówek wymieszać. Po upływie 30 min. odczytać wartość absorbancji, próby badanej wobec próby ślepej w długości fali 750 nm.

Stężenie białka odczytuje się z krzywej wzorcowej.

CHROMATOGRAFIA

5. CHROMATOGRAFIA

(wg. Kłyszewko - Stefanowicz L. Ćwiczenia z Biochemii

PWN W-wa 1982 str. 43 - 126

Jedną z metod frakcjonowania mieszanin związków biologicznie czynnych jest chromatografia. W metodzie tej podstawą rozdzielenia mieszaniny jest różna szybkość wędrówki (migracji) poszczególnych związków w ośrodkach porowatych uwarunkowana głównie różną zdolnością adsorpcyjną bądź jonowymienną składników mieszaniny lub też różną ich rozpuszczalnością w nie mieszających się ze sobą rozpuszczalnikach. Różne kryteria mogą stanowić podstawę definiowania różnych rodzajów chromatografii.

RODZAJE CHROMATOGRAFII

Z uwagi na siły fizyczne odgrywające rolę w procesie podziału substancji między fazą ruchomą i nieruchomą wyodrębnia się: CHROMATOGRAFIE ADSORPCYJNA, JONOWYMIENNA, PODZIAŁOWA, OSADOWA (chemichromatografia) i FILTRACJE.

5.1 CHROMATOGRAFIA ADSORPCYJNA

Metoda chromatografii adsorpcyjnej opiera się na zjawisku zatrzymywania substancji rozdzielających się na powierzchni ciała stałego będącego adsorbentem. Rozdział składników mieszaniny opiera się na różnym powinowactwie sorpcyjnym tych składników w czasie przesuwania się ich na powierzchni cząstek adsorbentu. Ruchliwość poszczególnych składników jest odwrotnie proporcjonalna do ich powinowactwa sorpcyjnego. Substancje o mniejszym powinowactwie do adsorbentu przesuną się na większą odległość niż substancje silnie adsorbowane o większym powinowactwie. Adsorbenty stosowane w chromatografii adsorpcyjnej powinny odznaczać się odpowiednią selektywnością, nie reagować z rozdzielanymi substancjami ani z rozpuszczalnikiem, oraz nie rozpuszczać się w rozpuszczalniku. W zależności od zdolności adsorpcyjnych można podzielić je na SŁABE (skrobia, sacharoza), ŚREDNIE (węgiel wapniowy, fosforan wapniowy), oraz SILNE (aktywowany kwas krzemowy, tlenek magnezowy).

CHROMATOGRAFIA

Rozdział chromatograficzny zależy jest od stopnia rozdrobnienia adsorbentu. W gruboziarnistym adsorbencie przepływ rozpuszczalnika jest szybszy. Rozpuszczalnikami mogą być: eter naftowy, kwasy organiczne, alkohole, eter etylowy, aceton, pirydyna.

Rozdział metodą chromatografii adsorpcyjnej przeprowadza się w kolumnie wypełnionej adsorbentem, który na skutek różnej zdolności adsorbowania poszczególnych składników mieszaniny powoduje, że składniki te umiejscawiają się na różnych wysokościach kolumny chromatograficznej. Następnie przeprowadza się tzw. rozwijanie chromatogramu, przepuszczając przez kolumnę rozpuszczalnik. Zasada przy doborze elementów układu chromatograficznego jest - aby aktywność adsorbentu i rozpuszczalnika były zbliżone np. przy użyciu silnego adsorbentu potrzebny jest bardziej aktywny rozpuszczalnik.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA



17

WYZNACZANIE IZOTERM ADSORPCJI ALBUMINY I KAZEINY NA FOSFORANIE TRÓJWAPNIOWYM

(wg. Brzeski W., Kaniuga Z.: Praktikum z biochemii PWR i L,
Warszawa 1968 s.127)

ZASADA: Wyznaczanie izoterm adsorpcji polega na wytrząsaniu określony czas i w stałej temperaturze roztworów o różnych stężeniach badanej substancji z jednakową ilością adsorbentu, a następnie na oznaczeniu spadku stężenia tej substancji w poszczególnych próbkach.

ODCZYNNIKI:

1. Roztwór albuminy $10\text{mg}/\text{cm}^3$ 0.1 M NaOH
2. Roztwór kazeiny $10\text{mg}/\text{cm}^3$ 0.1 M NaOH
3. 0.1 M NaOH
4. Wzorcowy roztwór albuminy i kazeiny (zawierający po $1\text{mg}/\text{cm}^3$ 0.1 M NaOH)
5. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in substancja
6. Odczynnik biuretowy

WYKONANIE: Do 5 probówek zawierających po 250 mg $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dodać: do pierwszej 5 cm^3 , do drugiej 4 cm^3 , do trzeciej 3 cm^3 , do czwartej 2

cm^3 i do piętej 1 cm^3 roztworu albuminy (10 mg/cm^3 0,1M NaOH). Objętość płynu we wszystkich probówkach uzupełnić 0,1 M roztworem NaOH do 5 cm^3 i wytrząsać 30 minut. Następnie zawiesinę z probówek przenieść ilościowo do probówek wirowniczych i wirować 10 minut przy 3000 obr/min. Roztwór z nad osadu zlać do cylinderka przez lejek z koreczkiem z waty. Osad przemyć $5 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$, mieszając dokładnie bagietką, po czym ponownie odwirować. Roztwór z nad osadu dotaczyć do odpowiednich roztworów w cylindrach. Zawartość cylinderków uzupełnić do $10 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$ dest. i wymieszać. Analogicznie postąpić z roztworem kazeiny oraz z próbkami kontrolnymi (5 cm^3 0,1M NaOH).

W uzyskanych roztworach obu białek a także w roztworach wzorcowych oznaczyć białko metodą biuretową. W tym celu do 1 cm^3 roztworu białka dodać 1 cm^3 odczynnika biurelowego, wymieszać i po 20 minutach oznaczyć ekstynkcje przy długości fali 525 nm wobec ślepej próby. Obliczyć zawartość białka w poszczególnych probówkach. Obliczyć ile białka (albuminy i kazeiny) zostało zaadsorbowane przez $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ w poszczególnych probówkach. Wykreślić izotermy adsorpcji odkładając na osi x stężenie białka w płynie po adsorpcji, na osi y objętość płynu.

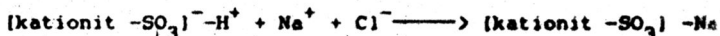
5.2 CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA

Chromatografia jonowymienna polega na wymianie wszystkich zdolnych do wymiany jonów jonitu (sorbentu) na inne jony o tym samym ładunku, zawarte w roztworze.

JONITY są to syntetyczne żywice o licznych grupach dysocjujących i kwasowych lub zasadowych. Każda grupa kwasowa ($-\text{SO}_3\text{H}$ lub $-\text{COOH}$) może uwalniać proton pozostający w pobliżu cząsteczki. Może być on usunięty, gdy inny dodatni jon zajmie jego miejsce.

KATIONITY są to więc wymieniacze jonowe o charakterze kwasów bądź ich soli, które wymieniają z roztworem kationy.

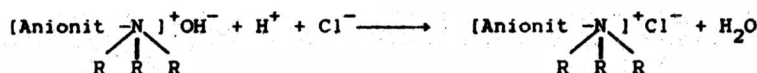
Przykładem wymiany jonowej na kationicie może być reakcja



W procesie sorpcji reakcja zachodzi ze strony lewej na prawo, w procesie regeneracji (elucji) w kierunku przeciwnym.

ANIONITY są to wymieniacze jonowe o charakterze zasad bądź ich soli, które wymieniają z roztworem aniony.

Proces wymiany jonowej na anionicie może zilustrować reakcja



Wymiana jonów pomiędzy jonami fazy stałej jonitu, a jonami z roztworu elektrolitu jest równoważnikowa. Ilość jonów usuwanych z jonitu jest równoważna ilości jonów wprowadzanych do wymieniacza jonowego. Wymiana jonów zachodzi między fazą stałą jonitu, oraz fazą ciekłą tj. roztworem elektrolitu, dlatego cechy chemiczne jonitu oraz elektrolitu odgrywają zasadniczą rolę w tym procesie..

Na przejście jonów z roztworu do jonitu i z jonitu do roztworu mają wpływ następujące czynniki:

1. Budowa wymieniacza
2. Ilość i rodzaj grup funkcyjnych jonitu
3. Energia wymienna jonów
4. Temperatura.

Przykłady ważniejszych KATIONITÓW:

Amberlit IR-10, Dowex-50, Zeokarb 215, Duolite C-25, Permutit H

Przykłady ważniejszych ANIONITÓW:

Amberlit IRA-400, Dowex 1, Permutit A, Duolite A-42.

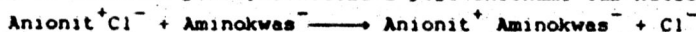
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA



18

WYMIANA JONÓW W PROCESIE KOLUMNOWYM

ZASADA: Aminokwasy w formie anionowej lub kationowej mogą wymieniać się na kolumnie jonowymieniacza z jego anionami lub kationami np.



CHROMATOGRAFIA

ODCZYNNIKI:

1. Dowex 1 x 8
2. 1 M roztwór NaOH (4%)
3. 1 M roztwór HCl
4. 0,1 M roztwór AgNO_3 (1,7%)
5. 1% roztwór kwasu glutaminowego

1g kwasu rozpuścić w kilkudziesięciu cm^3 wody z dodatkiem roztworu NaOH do uzyskania pH około 7,5 i uzupełnić wodą do 100 cm^3 .

PRZYGOTOWANIE KOLUMNY: kilka gram jonitu Dowex 1x8 załadować na kilkadziesiąt godzin kilkuset cm^3 wody. Po zdekantowaniu wody, osad jonitu przemywać na przemian 3-krotnie 1M roztworem HCl i 2-krotnie 1 M roztworem NaOH (zakończyć 1 M HCl) wg. następującej procedury: po dodaniu około 200 cm^3 1M roztworu HCl lub 1M roztworu NaOH wstawić na 10 minut do wrzącej łaźni wodnej przy ciągłym mieszaniu. Przesączyć przez lejek Buchnera i przemywać kilkanaście razy wodą do uzyskania odczynu obojętnego (lub zaniku reakcji na Cl^- z AgNO_3 w przesączu w przypadku HCl). Po ostatnim przemyciu wodą, przygotowaną zawiesinę jonitu przenieść do kolumny do chromatografii.

WYKONANIE: Obniżyć ciecz w kolumnie szklanej do górnego poziomu jonitu. Nanieść 1 cm^3 roztworu kwasu glutaminowego. Przez otwarcie kranu kolumny spowodować wsiąknięcie roztworu w złożę wymiennicza jonowego. Przemycając następnie kolumnę wodą zbierać po około 1 cm^3 wycieku do probówek zawierających 1 cm^3 roztworu AgNO_3 . Obserwować strącanie się jonów Cl^- wydobywających się z kolumny.

5.3. CHROMATOGRAFIA PODZIAŁOWA

Chromatografia podziałowa jest metoda oparta na podziale solutu (substancji rozpuszczonej w solwencie = rozpuszczalniku = układzie rozwijającym) pomiędzy dwie niemieszające się ze sobą fazy ciekłe, z których jedna jest ruchoma (najczęściej rozpuszczalnik organiczny), a druga nieruchoma osadzona na porowatym nośniku - (najczęściej woda). Porowaty nośnik może mieć postać kolumny lub bibuły. Warunkiem decydującym o rozdzieleniu substancji są różnice we współczynnikach podziału

CHROMATOGRAFIA

tych substancji między dwie nie mieszające się ze sobą fazy ciekłe. W zależności od techniki w chromatografii podziałowej można wyróżnić:

CHROMATOGRAFIE PODZIAŁOWA KOLUMNOWA I CHROMATOGRAFIE PODZIAŁOWA BIBUŁOWA.
--

5.3.1 CHROMATOGRAFIA PODZIAŁOWA KOLUMNOWA:

Chromatografia kolumnowa podziałowa z uwagi na rodzaje stosowanych faz dzieli się na: chromatografię w układzie CIECZ-CIECZ oraz chromatografię w układzie CIECZ-GAZ. W pierwszym wypadku fazę ruchomą i nieruchomą stanowią 2 niemieszające się ze sobą cieczce, a w drugim - faza ruchoma jest gaz.

Pierwszy rodzaj chromatografii znajduje zastosowanie do rozdzielu substancji rozpuszczających się w obydwu cieczach, drugi - do rozdzielu mieszaniny gazów lub par, które przepuszczone przez kolumnę z nieruchomą fazą ciekłą rozdzielają się wskutek selektywnej adsorpcji. Z nośników zatrzymujących fazę wodną zadawalającą właściwości wykazują: żel krzemionkowy, skrobia, miazga celulozowa, ziemia okrzemkowa. Jako nośnik o właściwościach hydrofobowych do zatrzymywania cieczy niepolarnych znalazły zastosowanie kauczuk wulkanizowany i chlorokauczuk. Jako fazę ruchomą stosuje się najczęściej w chromatografii podziałowej następujące rozpuszczalniki: chloroform, alkohol butylowy i amylowy, kwasy izo-masłowy, pirydyna, kolidyna, chinolina, krezol.

Najczęstsza metoda rozwijania w chromatografii podziałowej jest wymywanie. Poszczególne składniki mieszaniny na skutek różnych stosunków podziału przechodzą do fazy ruchomej z niejednakową szybkością, w wyniku czego następuje ich rozdzielanie.

5.3.2 CHROMATOGRAFIA PODZIAŁOWA BIBUŁOWA

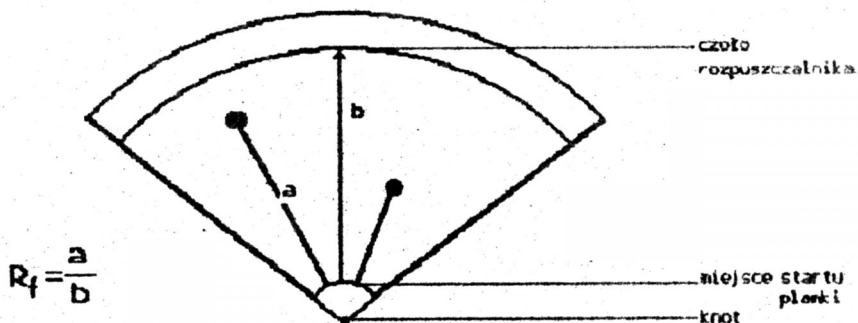
W chromatografii bibułowej nośnikiem fazy stacjonarnej (najczęściej polarnej) jest odpowiednio spreparowana bibuła filtracyjna nasyciona wodą. Faza ruchoma jest rozpuszczalnik organiczny. Rozpuszczalnik wsiąka w bibułę dzięki jej kapilarności, a także własnej sile ciężkości. Różne związki umieszczone w punkcie startu przemieszczają się wraz

CHROMATOGRAFIA

z rozpuszczalnikiem z szybkością zależną od ich współczynnika podziału między rozpuszczalnikiem organicznym a wodą nasycającą bibułę.

Ze względu na kierunek migracji fazy ruchomej w bibule wyróżnia się chromatografię **JEDNOKIERUNKOWĄ I DWUKIERUNKOWĄ**, a kształt bibuły powoduje podział na chromatografię **ARKUSZOWĄ, PASKOWĄ ORAZ KRAŻKOWĄ**. Do rozdzielania większości znanych substancji zarówno organicznych jak i nieorganicznych najbardziej nadają się bibuły Whatman.

Położenie rozdzielonych substancji określa się współczynnikiem R_f (od rate of flow - szybkość przepływu). **WSPÓŁCZYNNIK R_f W CHROMATOGRAFII BIBULOWEJ WYRAZA STOSUNEK ODLEGŁOŚCI ŚRODKA PŁAMY ROZDZIELANEGO ZWIĄZKU OD MIEJSCA STARTU DO ODLEGŁOŚCI CZOŁA ROZPUSZCZALNIKA OD LINII STARTU.**



$$R_f = \frac{a}{b}$$

$$R_f = \frac{a}{b} ;$$

a - Odległość środka plamy od miejsca startu w mm

b - Odległość czoła rozpuszczalnika od miejsca startu w mm.

Wartość R_f jest wielkością stałą i charakterystyczną dla danego składnika przy danym układzie fazy ruchomej oraz stałych warunkach doświadczania. Wartość współczynnika R_f zależy od wielu czynników: gatunku bibuły i jej czystości, temperatury, stopnia uwodnienia bibu-

CHROMATOGRAFIA

ty. stanu nasycenia komory i bibuły. od ilości i wieku rozpuszczalników, od czasu i drogi przepływu.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA



19

CHROMATOGRAFIA BIBUŁOWA - KRAŻKOWA AMINOKWASÓW

ODCZYNNIKI:

1. HCOOH (88-90%)
 2. n-butanol
 3. Wzorcowe roztwory aminokwasów
 - I. 0.01 M roztwór argininy (c.cz. 174,21)
 - II. 0.01 M roztwór alaniny (c.cz. 89,10)
 - III. 0.01 M roztwór izoleucyny (c.cz. 131,18)
 - IV. 0.01 M roztwór waliny (c.cz. 117,15)
 - V. 0.01 M roztwór tyrozyny (c.cz. 181,20)
 - VI. mieszanina w/w aminokwasów
 4. 0.5% roztwór ninhydryny w acetonie
- } w 0,1M HCl

WYKONANIE: Na obwód pola narysowanego na bibule Whatman nr.1 nanieść kapilarą roztwory aminokwasów w wymienionej wyżej kolejności. Plamki nakropionych aminokwasów nie powinny przekraczać ϕ 3 mm. Plamy nanoszonych aminokwasów wysuszyć na powietrzu. Złożyć knot i położyć chromatogram na płytce Petriego sanurając knot w rozpuszczalniku (n-butanol : HCOOH : H_2O = 75 : 15 : 10). Nakryć komorę wierzchnią płytką Petriego tak, aby brzegi krążka wystawały poza szalkę. Po zbliżeniu się czoła rozpuszczalnika do obwodu krążka bibuły wyjąć chromatogram, usunąć knot, a linię czoła obrysować zwykłym ołówkiem. Chromatogram wysuszyć w temp. pokojowej. Wywołać chromatogram spryskując 0.5% roztworem ninhydryny w acetonie i wysuszyć w temp. pokojowej (10min), a następnie w 60°C (5min). Plamy obrysować zwykłym ołówkiem i zaznaczyć ich środki. Zmierzyć drogę od miejsca startu do czoła rozpuszczalnika oraz od miejsca startu do środka plamy. Obliczyć R_f dla każdego aminokwasu wzorcowego oraz w mieszaninie. Zidentyfikować aminokwasy w mieszaninie.

5.4 CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Chromatografia cienkowarstwowa jest techniką rozdzielu substancji przy zastosowaniu adsorbentów w postaci cienkich warstw, uformowanych na płytkach ze szkła lub sztywnej folii. W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko adsorpcji związków, reakcji wymiany jonowej oraz podział między fazy. Najczęściej ma miejsce kombinacja wszystkich 3 zjawisk, z przewagą jednego z nich. Wspólną cechą jest wykorzystanie odpowiednio cienkiej warstwy adsorbentu. W zależności od grubości warstwy zmienia się szybkość przepływu rozpuszczalnika; im warstwa jest cieńsza, tym większa jest szybkość przepływu, a więc krótszy czas rozdzielu składników mieszaniny.

Adsorbenty stosowane w chromatografii cienkowarstwowej można podzielić na NIEORGANICZNE i ORGANICZNE. Do tych pierwszych należą przede wszystkim: żel krzemionkowy (Silica Gel G, Silica Gel H, Kieselgel) i ziemia okrzemkowa (Kieselgur), natomiast do organicznych - celuloza i Sephadex.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA



20

CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA NA PŁYTKACH POKRYTYCH KIESELGEL'EM

ODCZYNNIKI:

1. Płytki pokryte żelem krzemionkowym
(Kieselgel G lub Silica Gel G)
2. n-butanol
3. CH_3COOH - lodowaty
4. 0.2 M wodne roztwory wzorcowe cysteiny (c.c.z. 121.16),
glicyny (c.c.z. 75.07)
kwasu glutaminowego (c.c.z. 147.14)
5. Hyrolizat glutationu
6. Odczynnik ninhydrynowy (do 95 cm^3 0.5% roztworu ninhydryny w acetonie dodać 1 cm^3 kwasu octowego lodowatego i 4 cm^3 wody; odczynnik przygotować bezpośrednio przed użyciem).

CHROMATOGRAFIA

WYKONANIE: Na płytce zaznaczyć linię startu w odległości 2 cm od krótszego brzegu za pomocą dobrze zatemperowanego ołówka. Na linii zaznaczyć w równych odległościach 4 punkty, na których nanieść po 0,05 cm³ roztworów cysteiny, glicyny i kwasu glutaminowego i hydrolizatu glutationu. Płaty suszyć strumieniem powietrza. Na górnym przeciwległym do linii startu brzegu płytki plamy oznaczyć numerami i napisać co zawierają. Chromatogram rozwinąć w układzie: n-butanol - CH₃COOH - H₂O (60:20:20) na odległość 10 cm. Po dojściu rozpuszczalnika do tej wysokości zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika, płytkę wyjąć i wysuszyć w pozycji poziomej w temp. 60°C. Po wysuszeniu płytkę ustawić pionowo i spryskać roztworem ninhydryny z rozpylacza. Wysuszyć na powietrzu, poczem płytki umieścić w temp. 60°C na 5 min.

Obliczyć współczynnik R_f i na ich podstawie zidentyfikować aminokwasy w hydrolizacie.

5.5. CHROMATOGRAFIA MOLEKULARNO - SITOWA (SACZENIE MOLEKULARNE)

Do rozdzielania składników mieszanin o różnych wielkościach cząstek stosować można struktury porowate - żele, spełniające w procesie rolę sita.

5.5.1. DIALIZA

Pewna odmiana sita molekularnego jest DIALIZA, w której rolę sita pełni porowata półprzepuszczalna błona tzw. błona dializacyjna. Zjawisko dializy wykorzystywane jest w praktyce laboratoryjnej do rozdzielania związków wysokocząsteczkowych np. białek od drobnocząsteczkowych soli mineralnych.

Najczęściej dializa stosowana jest do odsalania roztworów białek po uprzednim ich frakcjonowaniu przez wysalanie np. siarczanem amonu. Drobnocząsteczkowe jony przedyfundują z worka dializacyjnego, do rozpuszczalnika natomiast makrocząsteczki pozostają w worku dializacyjnym. Całkowite usunięcie substancji drobnocząsteczkowych z mieszaniny ze związkiem wysokomolekularnym wymaga częstego wymieniania rozpuszczalnika, bądź odpowiednio dużej objętości rozpuszczalnika.

5.5.2. SACZENIE NA ŻELACH SEPHADEX

Przy rozdzielaniu mieszanin o różnej wielkości cząsteczek poszczególnych składników stosuje się żele (struktury porowate), spełniające rolę sita. Jony i substancje drobnocząsteczkowe łatwo dyfundują w głąb ziarenek żelu, natomiast wielkie cząsteczki nie wchodzi do wnętrza ziarenek żelu, na skutek zatrzymywania ich przez gęstą sieć substancji żelowej. Zatem większe cząsteczki będą eluowane wcześniej niż cząsteczki mniejsze, a zdolność rozdzielcza będzie tym większa im większe okażą się różnice pomiędzy rozmiarami cząsteczek rozdzielanych związków. Ta zdolność rozróżniania przez ziarenka żelu cząsteczek o różnych rozmiarach stała się podstawą techniki rozdzielczej określonej mianem filtracji żelowej inaczej saczenia na sitach molekularnych.

Filtrację przeprowadza się na żelach "SEPHADEX", które są odpowiednio chemicznie spreparowanymi dekstranami, w wyniku czego liniowe cząsteczki polisacharydów uzyskują wiele hydrofilnych grup oraz tworzą silnie usieciowane trójwymiarowe agregaty. Od stopnia usieciowania preparatów zależy jego zdolności rozdzielcze. Liczba takich poprzecznych mostków pomiędzy łańcuchami dekstranu wyznacza jednocześnie rozmiary "oczek" tak utworzonej sieci. Im więcej poprzecznych "mostków" znajduje się w sieci, tym mniejsze będą jej "oczka". Jest to podstawa rozróżniania żelu Sephadex - o różnych rozmiarach "oczek" sieci. Żelem o najmniejszych oczkach jest G-10, natomiast o największych G-200.

5.6. CHROMATOGRAFIA POWINOWACTWA

Chromatografia powinowactwa jest typem chromatografii adsorpcyjnej, w której wykorzystuje się wzajemne powinowactwo dwóch substancji biologicznie czynnych. Jedna z nich, kowalencyjnie związana z nierozpuszczalnym nośnikiem i zwana ligandem, specyficznie adsorbując drugą substancję, izolując ją z mieszaniny innych związków.

Wiązanie substancji rozpuszczonej w fazie ruchomej z ligandem związanym z nośnikiem może mieć różny charakter. Może to być wiązanie enzymu z substratem, enzymu z inhibitorem, białka z receptorem, białka z antygenem, białka z aptenem, komplementarnych od sinków kwasów nukleinowych, kwasów nukleinowych z białkami, białka

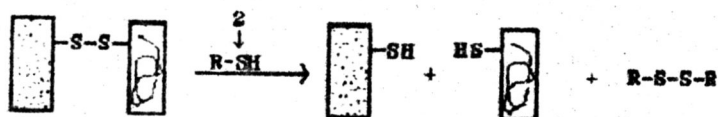
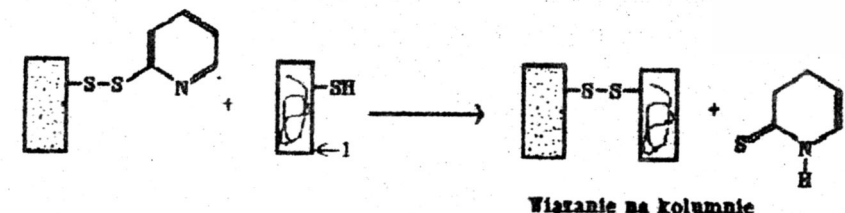
CHROMATOGRAFIA

cza z przeciwciałami. Jako nośnik najczęściej wykorzystywane są sita molekularne, w odpowiedni sposób zaktywowane.

W ostatnich latach coraz częściej stosowanym nośnikiem jest Sepharoza, produkowana z agarozy, Bio-Gel P, Enzakryl - hydrofilowy kopolimer akrylamidu.

Przykładem chromatografii powinowactwa - szczególnego rodzaju jest chromatografia kowalencyjna. Metoda ta w tym przypadku polega na utworzeniu wiązań kowalencyjnych (S-S) między fazą stacjonarną a rozdzielanymi substancjami.

Zasadę tego rodzaju chromatografii ilustruje rys.



Rys. Chromatografia kowalencyjna (wg. Strzeżek J., Wołos A.: Ćwiczenia z biochemii. ATR, Olsztyn 1986 str. 31.)

1. Białko zawierające grupy sulfhydrylowe
2. Drobnocząsteczkowy związek zawierający grupy sulfhydrylowe

6. ELEKTROFOREZA

Pojciem elektroforeza określane jest zjawisko rozdzielu mieszaniny związków (drobno i wielkocząsteczkowych) posiadających dodatni lub ujemny ładunek w polu elektrycznym. Rozdział dokonuje się w wyniku różnic w szybkości wędrowania tych obciążonych ładunkiem związków. Elektroforezę można przeprowadzać w roztworze i wówczas jest to -

ELEKTROFOREZA

elektroforeza swobodna, bądź w nośnikach. Nośnikami mogą być najróżniejsze substancje jak : bibuła, żel krzemionkowy, celuloza, ager, skrobia, żel poliakrylamidowy i.t.p. Ze względu na zastosowane napięcie elektryczne, metody elektroforezy można podzielić na :

1. Niskonapięciowa elektroforeza bibułowa
2. Niskonapięciowa elektroforeza żelowa
3. Wysokonapięciowa elektroforeza bibułowa (elektrochromatografia wysokonapięciowa)
4. Immunoelektroforeza

6.1. NISKONAPIĘCIOWA ELEKTROFOREZA BIBUŁOWA

Proces elektroforezy na bibule uzależniony jest od różnych czynników: od procesów elektrokinetycznych (zjawisko elektroosmozy, dyfuzji) i od procesów elektrofizycznych (pH i siła jonowa stosowanego buforu, wielkość napięcia i natężenia prądu). Bufor stanowi środowisko, w którym na fazie stałej: na bibule ma miejsce przesuwania się cząsteczek. Przy doborze buforów zwraca się uwagę na :

1. Stężenie jonów wodorowych (pH)
2. Siłę jonową / $\mu = \frac{1}{2} \sum C \times W^2$

gdzie μ - siła jonowa

C - stężenie jonów w mol/dm³

W - wartościowość jonów

3. Wartościowość jonów
4. Skład chemiczny buforów

Punkty izoelektryczne białek krwi wahają się od pH = 4.7 do 7.0. Dlatego najlepsze do rozdzielu okazały się bufony o pH 6.0 - 9.0. W elektroforezie bibułowej najlepsze wyniki osiąga się przy sile jonowej (μ) 0.06 do 0.1. Zwiększenie siły jonowej poprawia ostrość rozdzielu, zmniejsza jednak ruchliwość cząsteczek białka.

Do buforów używa się jedynie jonów jednowartościowych, wielowarto-

ELEKTROFOREZA

ciowe jony ulegają adsorpcji na cząsteczkach białek i zmniejszają szybkość ich wędrówki. Najczęściej używa się buforów WERONALOWYCH lub BORANOWYCH.

Im wyższe napięcie prądu, tym większa ruchliwość białek ale równocześnie i wyzwalać większe ilości ciepła Joula. Wyzwalanie większych ilości ciepła powoduje wzrost temperatury i możliwość denaturacji białka oraz zwiększenie parowania wody z buforu, a w związku z tym - zmianę warunków elektroforezy. Optymalna różnica potencjałów między biegunami wynosi zwykle 3,5 - 5 V/cm długości paska. Natężenie zależy od napięcia, siły jonowej buforu i właściwości bibuły. Optymalne natężenie wynosi 0,1 - 0,5 mA na 1 cm szerokości paska.

Aparatura do elektroforezy składa się z komory i zasilacza prądu stałego. Komora składa się z naczyń elektrodowych i elektrod. Elektrody mogą być metalowe: platyna, srebro, cynk, cyna, stal bądź grafitowe.

W wyniku elektroforezy bibułowej białek surowicy ludzi zdrowych uzyskuje się 5 frakcji:

Albuminy ok. 65%,

α_1 -globuliny - ok. 2%,

α_2 -globuliny- ok. 5%

β -globuliny- ok. 11%

γ -globuliny- ok. 17%.

6.2. NISKONAPIĘCIOWA ELEKTROFOREZA ŻELOWA

W elektroforezie żelowej nośnikami są: żel skrobiowy, żel poliakrylamidowy, żel agarowy. Zasada rozdzielania jest podobna do metody elektroforezy bibułowej, ponieważ rozdział substancji badanej zachodzi na skutek różnic w ruchliwości obdarzonych ładunkiem związków w polu elektrycznym. Przy elektroforezie na żelu dodatkową rolę odgrywają różnice w wielkości cząstek na zasadzie saczenia molekularnego.

Rozdziály elektroforetyczne są dokonywane na płytkach szklanych zalanych agarem (elektroforeza agarowa), na błonach skrobiowych (elektroforeza skrobiowa), w rurkach szklanych wypełnionych spolimeryzowanym amidem kwasu akrylowego (elektroforeza na żelu poliakrylamidowym). Zaletą tych technik jest szybki rozdział oraz uzyskiwanie znacznie większej ilości frakcji (6-30) w porównaniu z elektroforezą bibułową.

ELEKTROFOREZA

6.3. WYSOKONAPIĘCIOWA ELEKTROFOREZA BIBUŁOWA

Metoda ta stosowana jest do rozdzielu związków drobnocząsteczkowych np. aminokwasów. Elektroforezę przeprowadza się w specjalnie skonstruowanym aparacie - zapewniającym dobre chłodzenie, tak aby nie dopuścić do przegrzewania bibuły. W przypadku aminokwasów często stosuje się elektrochromatografię tzn. po rozdziale elektroforetycznym (zwykle 1 godz. przy napięciu 1600- 2000 V) elektroforetogram suszy się, a następnie rozwija chromatograficznie w kierunku prostopadłym do elektroforezy.

6.4. IMMUNOELEKTROFOREZA

Metoda immunoelektroforezy stanowi połączenie elektroforezy w żelu z immunodyszfuzją. W początkowym etapie przeprowadza się elektroforezę badanej surowicy w żelu agarowym lub agarozowym. Po jej ukończeniu przeprowadza się reakcje precipitacyjne (strącaniowe) pomiędzy antygenami zawartymi w białkach surowicy i przeciwciałami zawartymi w nioszonej dopiero teraz, surowicy odpornościowej. W wyniku reakcji powstają charakterystyczne łuki precipitacyjne. Umożliwia to precyzyjniejszą informację o obecności lub braku jakiejś frakcji białkowej.

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

7. ENZYMY

Reakcje chemiczne w organizmie są zawsze przyspieszane przez swoiste katalizatory komórkowe, zwane BIOKATALIZATORAMI lub ENZYMAMI. Enzymy nie zmieniają końcowego składu mieszaniny reagującej ani stałej równowagi danej reakcji, przyspieszają jedynie osiągnięcie stanu równowagi w reakcjach termodynamicznie możliwych, poprzez obniżenie tzw. ENERGII AKTYWACJI.

ENZYMY SĄ ZŁOŻONYMI, CIEPŁOCHWYJNYMI, WIELKOCZĄSTECZKOWYMI KATALIZATORAMI O CHARAKTERZE BIAŁKOWYM, WYTWARZANYMI WYŁĄCZNIE PRZEZ ŻYWE KOMÓRKI I ODZNACZAJACYMI SIĘ WYSOKĄ SWOISTOŚCIĄ W PRZYSPIESZENIU LUB NADAWANIU ODPOWIEDNIEGO KIERUNKU REAKCJOM CHEMICZNYM.

Przeważnie są to białka globularne, z pośród których tylko nieliczne mają charakter białek prostych (składających się wyłącznie z aminokwasów).

[SWOISTOŚĆ ENZYMÓW] tj. zdolność reagowania z określonymi substancjami oraz zdolność do katalizowania określonych reakcji zależy od konformacji przestrzennej fragmentu łańcucha polipeptydowego, zwanego CENTRUM AKTYWNYM.

7.1 CHARAKTERYSTYKA CENTRUM KATALITYCZNEGO

- 1 - Miejsce aktywne zajmuje mała część całkowitej objętości cząsteczki enzymu.
- 2 - Miejsce aktywne jest układem przestrzennym, złożonym z grup chemicznych, leżących w różnych pozycjach liniowej sekwencji aminokwasów.
- 3 - We wszystkich poznanych od strony struktury enzymach, miejsce aktywne znajduje się w zagłębieniu powierzchni enzymu, niedostępnym właściwie dla cząsteczek wody.
- 4 - W centrum katalitycznym wyróżnia się reszty aminokwasów, pełniących rolę grup kontaktowych oraz reszty pełniące rolę grup pomocniczych. Stwierdzono np., że dla wielu esteraz, proteaz i

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

mutaz SERYNA jest jednym z głównych elementów centrum katalitycznego. Ustalono też, jakie aminokwasy sąsiadują z seryną. W wielu enzymach stwierdzono występowanie podobnych triad:

ASP-SER-GLU czy GLU-SER-ALA.

CENTRALNA ROLA przypisuje się również CYSTEINIE, gdyż może ona wiązać grupy fosforowe, acylowe i inne w czasie działania enzymu. Brana jest również pod uwagę zasadowa grupa imidazolowa - HISTYDYN, guanidynowa - ARGININ czy ϵ -aminowa LIZYNY oraz grupy karboksylowe kw. GLUTAMINOWEGO i kw. ASPARAGINOWEGO.

- 5 - W tworzeniu kompleksu [ENZYM-SUBSTRAT] biorą udział trzy rodzaje sił: wiązania elektrostatyczne, wiązania wodorowe i siły van der Waalsa. Siły te są stosunkowo słabe, odpowiadają energii swobodnej wiązania od 12,56 do 50,24 KJ/mol (od 3 do 12 Kcal/mol). Te trzy podstawowe wiązania niekowalencyjne różnią się między sobą, specyficznością i wymaganiami geometrycznymi. Poszczególne wiązania w różny sposób ulegają wpływowi cząsteczek wody, wywierając na nie silny wpływ.

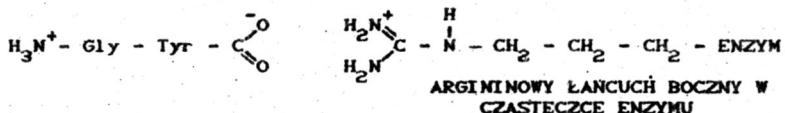
- 6 - [SPECYFICZNOŚĆ] wiązania enzymu z substratem zależy od precyzyjnie określonego ułożenia atomów w miejscu aktywnym. Początkowo porównywano układ enzym-substrat do klucza i zamka [teoria [FISCHERA)]. Ostatnie prace wykazują, że miejsca aktywne niektórych enzymów nie są strukturami sztywnymi. [Model KOSHLANDA] zakłada, że kształt miejsca aktywnego enzymów ulega modyfikacji na skutek wiązania z substratem. Komplementarny kształt miejsca aktywnego do substratu pojawia się dopiero po związaniu substratu. Taki proces dynamicznego rozpoznania nazwano [INDUKOWANYM (wymuszonym)] dopasowaniem się enzymu.

7.11 WIAZANIA ELEKTROSTATYCZNE

Obciążone ładunkiem substraty mogą wiązać się z przeciwnie naładowanymi resztami enzymów. Przykładem tego oddziaływania elektrostatycznego jest wiązanie GLICYLO-L-TYROZINY z KARBOKSYPEPTYDAZĄ A. Ujemnie naładowana końcowa grupa karboksylowa tego substratu oddziałuje z dodatnio naładowaną grupą guanidynową reszty argininowej. Odległość po-

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

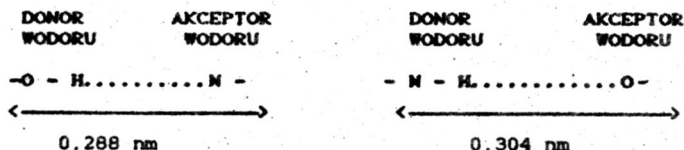
między tymi przeciwnie naładowanymi grupami wynosi 0,28 nm.



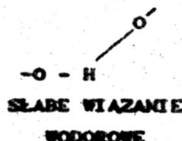
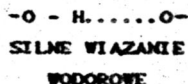
Omawiany rodzaj oddziaływania nazwano też wiązaniem (mostkiem) solnym lub para jonowa.

7.12. WIAZANIA WODOROWE

Znaczny wkład w oddziaływanie enzymów z substratami, mają wiązania wodorowe. Cząsteczki polarne zawierające atomy wodoru związane z silnie elektroujemnymi pierwiastkami np. tlenu, azotu czy chloru wykazują silne oddziaływanie międzycząsteczkowe. Spowodowane jest to dużą polarnością wiązania **[TLEN - WODÓR]**, **[AZOT - WODÓR]** i **[FLUOR - WODÓR]**. Polarność ta powoduje, że jądro atomu wodoru może przyciągać wolne pary elektronów należące do innych atomów. Powstaje wówczas wiązanie około 10 - 30 razy słabsze od wiązania atomowego, ale kilkadziesiąt razy silniejsze od przyciągania wywołanego siłami van der Waalsa. Nosi ono nazwę **WIAZANIA WODOROWEGO (PROTONOWEGO)** lub **MOSTKA WODOROWEGO**. Zazwyczaj we wzorach strukturalnych oznacza się je linią kropkową. Atom, z którym wódór jest związany kowalencyjnie jest **[DONOREM WODORU]**, drugi atom - jego **[AKCEPTOREM]**



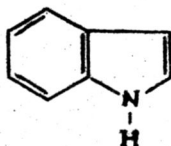
NAJSILNIEJSZE WIAZANIE WODOROWE powstaje wtedy, kiedy donor, atom wodoru i akceptor leżą w jednej linii, są kolinearne. Kiedy atom akceptorowy leży pod kątem do linii łączącej wódór z atomem donorowym, wtedy wiązanie jest dużo słabsze.



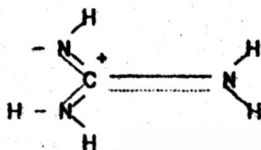
ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

Śród dwudziestu podstawowych aminokwasów, jedenastcie ma łańcuchy boczne mogące tworzyć wiązania wodorowe. Reszty aminokwasowe, zdolne do tworzenia wiązań wodorowych, można pogrupować w zależności od rodzajów wiązań:

1. Łańcuchy boczne TRYPTOFANU, ARGINYNY służą wyłącznie jako donory w wiązaniach wodorowych

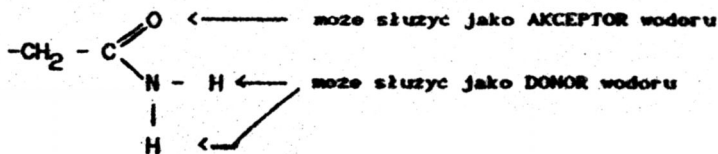


GRUPA BĘDĄCA
DONOREM WODORU
W TRYPTOFANIE



GRUPY BĘDĄCE
DONOREM WODORU
W ARGININIE

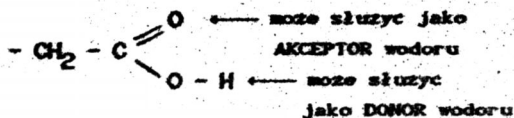
2. Łańcuchy boczne ASPARAGINY, GLUTAMINY, SERINY I TREONINY, podobnie jak ugrupowania peptydowe, moga służyć jako donory i akceptory w wiązaniach wodorowych



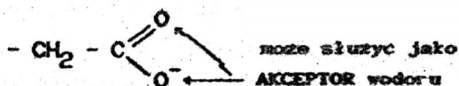
ASPARAGINA lub GLUTAMINA

3. Możliwości tworzenia wiązań wodorowych przez [LIZYNE] (grupe α -amino-
wa). KW. GLUTAMINOWY, KW. ASPARAGINOWY (końcowe grupy karboksylo-
we). TYROZYNE, HISTYDYNE zmieniają się w zależności od pH. Wymie-
nione grupy moga służyć jako akceptory lub jako donory wodoru w
określonych zakresach pH. Możliwość tworzenia wiązań wodorowych
przez reszty aminokwasowe zdolne do jonizacji zależy więc od pH.

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA



PROTONOWANA POSTAC
KW. ASPARAGINOWEGO
lub GLUTAMINOWEGO



ZJONIZOWANA POSTAC
KW. ASPARAGINOWEGO
lub GLUTAMINOWEGO

7.13. SIŁY VAN DER WAALSA

Kiedy dwa atomy zbliżają się na odległość od 0.3 do 0.4 nm, pojawia się między nimi niespecyficzna siła przyciągania. To oddziaływanie nazwane wiązaniem van der Waalsa, jest słabsze i mniej specyficzne od wiązania elektrostatycznego i wodorowego, co nie umniejsza jednak jego znaczenia w biologii. Siła przyciągania pomiędzy dwoma atomami rośnie, kiedy odległość między nimi maleje, do odległości van der Waalsa. Energia wiązania van der Waalsa dla jednej pary atomów wynosi około 4,18 KJ/mol (1kcal/mol). Znaczenie sił Van der Waalsa w wiązaniu międzycząsteczkowym pojawia się wtedy, gdy wiele atomów substratu wchodzi jednocześnie w bliski kontakt z licznymi atomami enzymu, a ma to miejsce wówczas, kiedy enzym i substrat są przestrzennie komplementarne.

Woda, ze względu na polarność, ma zdolność jednoczesnego występowania jako donator i jako akceptor wodoru, może ona zmniejszać siły wiązań elektrostatycznych i wodorowych pomiędzy innymi cząsteczkami i jonami. Po związaniu enzymu z substratem woda ulega w znacznym stopniu usunięciu, a to wzmacnia oddziaływania elektrostatyczne i wodorowe pomiędzy enzymem i substratem.

7.2 BUDOWA ENZYMÓW

Poza nielicznymi enzymami prostymi zbudowanymi tylko z aminokwasów pozostałe oprócz, łańcuchów polipeptydowych zawierają w swoim składzie związki nieaminokwasowe. Wyróżnia się zasadniczo dwa typy składników nieaminokwasowych. Jeśli białko (APOENZYM) związane jest ze składnikiem nieaminokwasowym trwale wiązaniami kowalencyjnymi nosi wówczas

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

Nazwe grupy PROSTETYCZNEJ. (np. układ żelazoprotoporfirynowy w katalazie i peroksydazie).

HOLOENZYM = APOENZYM + KOENZYM (bądź grupa PROSTETYCZNA)

Drugim typem składników nieaminokwasowych holoenzymów są KOENZYMY, dające się oddzielić od apoenzymu poprzez dializę (np. koenzymy niacynowe; NAD, NADP).

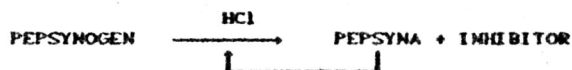
Niektóre enzymy mają po kilka centrów katalitycznych, co może wynikać ze struktury czwartorzędowej (budowa podjednostkowa) ich cząsteczek. Oprócz centrów katalitycznych enzymy mają tzw. CENTRA REGULACYJNE, które w zależności od swej lokalizacji noszą nazwę IZOSTERYCZNYCH (położonych w obrębie centrów katalitycznych) lub ALLOSTERYCZNYCH (leżących poza centrum aktywnym).

Centra te są miejscem wiązania związków chemicznych, zwanych EFEKTORAMI (aktywatorami lub inhibitorami), które wywołując zmiany konformacyjne w białku enzymu, powodują zmiany jego aktywności. Mechanizm procesów aktywacji jest mało znany. Wiele przemawia za tym, że działanie aktywatora polega na ułatwianiu powstawania układu enzym-substrat. Możliwe też, że aktywator wiąże się z białkiem enzymu lub substratem, a zaktywowany substrat łatwiej poddaje się działaniu enzymu. Specyficzność tego typu aktywatorów nie jest zbyt duża. Stwierdzono np. że w procesach transfosforylacji, przeprowadzanych z udziałem ATP, aktywator Mg^{+2} może być z powodzeniem zastąpiony przez jony Mn^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} czy Ni^{+2} .

Aktywatorami mogą być również aniony, np. amylaza ślinowa jest aktywowana jodem Cl^- , który może być zastąpiony przez jon Br^- , NO_3^- lub inny anion (aktywujący jednak z mniejszym efektem).

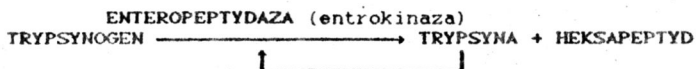
7.3. PREENZYMY

Niektóre enzymy są wytwarzane w postaciach nieczynnych, jako tzw. **ZYMOGENY** lub **PREENZYMY**. Spośród preenzymów najlepiej poznane zostały enzymy proteolityczne. Np. **PEPSYNOGEN** w świetle żołądka pod wpływem kwasy solnego jest aktywowany do PEPSYNY, przez odsczepienie peptydu o masie cząsteczkowej około 3100 - blokującego centrum aktywne.



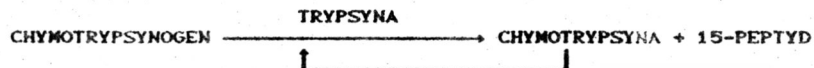
ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

W soku trzustkowym stwierdzono także obecność nieczynnych enzymów proteolitycznych. Występuje tam: TRYPSYNOGEN, dwie odmiany CHYMOTRYPSYNOGENU, DWIE PREKARBOKSYPEPTYDAZY. Ustalono, że w trypsynogenie inhibitorem jest heksapeptyd, umieszczony na końcu łańcucha enzymatycznego białka, który pod wpływem enzymu ENTEROPEPTYDAZY (dawniej zwanej enterokinazą) w środowisku obojętnym (pH = 7-9) zostaje uwolniony.



Uczynnianie trypsynogenu przez trypsynę i pepsynogenu przez pepsynę jest przykładem tzw. AUTOKATALIZY.

Uczynnianie chymotrypsynogenu zapoczątkowuje trypsyna, a powstała chymotrypsyna prowadzi ten proces dalej, usuwając kolejno kilka peptydów. Dzięki temu powstaje kilka odmian chymotrypsyny oznaczonych greckimi literami π , α , δ .



7.4. HETEROENZYMY

Wiele enzymów spełniających tę samą funkcję katalityczną występuje w różnych molekularnych formach. Różnice te mogą wynikać z odmiennej struktury pierwszorzędowej lub z różnych kombinacji odmiennych podjednostek. Wyróżniana jest grupa enzymów zwanych HETEROENZYMAMI. Są to białka o tej samej funkcji katalitycznej, ale o różnej budowie, wynikającej z różnic gatunkowych organizmów. Różnice te dotyczą struktury pierwszorzędowej i wynikły w procesie ewolucji, są one tym większe im gatunki są bardziej odległe filogenetycznie.

Na ogół różnice w strukturze I - rzędowej centrów katalitycznych są niewielkie, a znacznie większe w budowie innych odcinków łańcucha polipeptydowego.

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

7.5. IZOENZYM

Izoenzymami nazywamy enzymy pochodzące z różnych tkanek, katalizujących te same reakcje, w związku jednak z funkcją różnych narządów WYKAZUJĄ ODMIENNĄ KINETYKĘ (powinowactwo, wrażliwość na działanie inhibitorów) i WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE BIAŁKA (ładunek i ruchliwość w polu elektrycznym, wielkość cząsteczki, wrażliwość na denaturację ciepłą itd.).

Klasycznym przykładem izoenzymów jest DEHYDROGENAZA MLECZANOWA (LDH). Dehydrogenaza mlecznowa występująca w surowicy jest mieszaniną 5 izoenzymów, a więc 5 białek różniących się między sobą strukturą podjednostkową, tworzącą tetramery. Tetramery zbudowane są z podjednostek H (heart - serce) i M (muscle - mięsień).

Tworzą się następujące kombinacje podjednostek: H_4 , H_3M , H_2M_2 , HM_3 i M_4 - oznaczone jako LDH₁, LDH₂, LDH₃, LDH₄, LDH₅, z których LDH₅ wędruje w elektroforezie najszybciej a LDH₁ najwolniej.

Monomery	stramery	Izoenzymy
H	H_4	LDH ₁
Monomery	H_3M	LDH ₂
M	H_2M_2	LDH ₃
	HM_3	LDH ₄
	M_4	LDH ₅

LDH₁₋₂ występuje w mięśniu sercowym, LDH₄₋₅ w mięśniach i wątrobie, a LDH₂₋₄ w innych narządach i tkankach nowotworowych.

PRAWIDŁOWA AKTYWNOŚĆ LDH W SUROWICY KRWI WYNOŚI 70-300 U (1.1 - 5.0 μ KAT/l), w tym LDH₁ stanowi 54.14%, LDH₅ - 30.14% i LDH₄ - 15.13%. W chorobach serca wzrasta poziom LDH₁, natomiast w chorobach wątroby LDH₅.

7.6. JEDNOSTKA AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Szybkość reakcji chemicznej definiuje się jako ilość substancji przekształconej w jednostce czasu. W obowiązującym obecnie międzynarodowym układzie SI jednostką czasu jest sekunda, natomiast jednostką

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

ilości substancji jest mol. Odpowiada temu jednostka aktywności enzymatycznej zwana KATALEM: 1 KATAL (SKRÓT KAT) wywołuje w określonych warunkach reakcyjnych przemianę 1 mola substancji w ciągu 1 sek.

Jednostka ta jest za duża do celów praktycznych. W warunkach laboratoryjnych aktywności mierzy się w mikrokatalach (μ KAT) lub nanokatalach (nKAT).

Często jest jeszcze stosowana wprowadzona w 1960r przez Komisję Enzymową Międzynarodowej Unii Biochemicznej "JEDNOSTKA MIĘDZYNARODOWA" - odpowiadająca przemianie 1 mikromola substratu w ciągu 1min. (U).

$$1U = 16.67 \text{ nKAT}; \quad 1\text{nKAT} = 0.06U$$

$$1\mu\text{KAT} = 60U$$

7.7.SZYBKOSC REAKCJI ENZYMATYCZNEJ.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA SZYBKOSC REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

Na szybkość reakcji enzymatycznych wpływają:

1. Stężenie substratu
2. Stężenie enzymu
3. Obecność nadmiar produktu lub substratów
4. Temperatura
5. pH środowiska
6. Obecność aktywatorów
7. Obecność inhibitorów

7.7.1 KINETYKA REAKCJI CHEMICZNYCH

Reakcje chemiczne można klasyfikować na podstawie ich kinetyki tj. ustalenia charakteru reakcji i matematycznego ujęcia zależności pomiędzy szybkością reakcji a czasem jej trwania.

SZYBKOSC REAKCJI CHEMICZNEJ jest w każdej chwili proporcjonalna do stężenia substancji reagujących i oznacza ona stosunek przyrostu stężenia (lub ubytku stężenia substratu) do czasu, w którym ten przyrost (ubytek) nastąpi.

MIARA SZYBKOSCI REAKCJI w danym momencie jest przyrost produktu

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

(lub ubytek stężenia substratu), jaki by nastąpił w jednostce czasu, gdyby szybkość reakcji w tym czasie była niezmienna. Szybkość reakcji chemicznej jest pochodną stężenia względem czasu.

$$V = - \frac{dc \text{ substratu}}{dt} = + \frac{dc \text{ produktu}}{dt}$$

GDY SUBSTRAT STANOWI JEDEN RODZAJ SUBSTANCJI MAMY DO CZYNIEŃIA Z RÓWNANIEM REAKCJI I RZEDU.

$$V = - \frac{dc}{dt} = k \cdot c$$

RZEDEM REAKCJI NAZYWAMY SUME WYKŁADNIKÓW POTĘGOWYCH, W JAKICH WYSTĘPUJĄ STĘŻENIA W RÓWNANIU KINETYCZNYM

Gdy stężenie początkowe substratu równa się a , a stężenie substratu zmienionego równa się x to stężenie substratu w danej chwili równa się $a - x$, stężenie substratu po czasie t równe jest

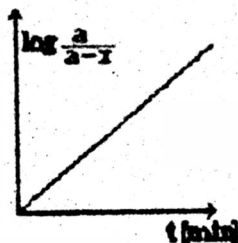
$$\frac{dx}{dt} = k (a - x)$$

Aby obliczyć stałą szybkości reakcji I rzędu należy równanie przedstawić w formie:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} = \frac{2,303}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

ponieważ wyrażenie $\frac{a}{a-x}$ jest stosunkiem stężeń, wobec tego wartość stałej k nie zależy od jednostek stężenia, a tylko od jednostek w jakich jest wyrażony czas (sek^{-1}) względnie (min^{-1}).

Wykres zależności $\log \frac{a}{a-x}$ od t w reakcjach I rzędu jest linią prostą.



ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

Gdy w reakcji zmieniają się stężenia dwóch substratów zachodzi
REAKCJA II RZEDU

$$V = - \frac{dc_A}{dt} = - \frac{dc_B}{dt} = k [C_A][C_B]$$

Jeżeli początkowe stężenie substratów A i B wynoszą a i b, zaś x wyraża ilość przekształconych substratów, wówczas

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x)(b-x)$$

$$k = \frac{1}{t(a-b)} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} = \frac{2,303}{t(a-b)} \log \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$$

gdy $a = b$ wówczas

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x)^2$$

$$k = \frac{1}{t} \cdot \frac{x}{a(a-x)}$$

W reakcji II rzędu stała szybkości reakcji zależy od jednostek stężenia i czasu ($\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$).

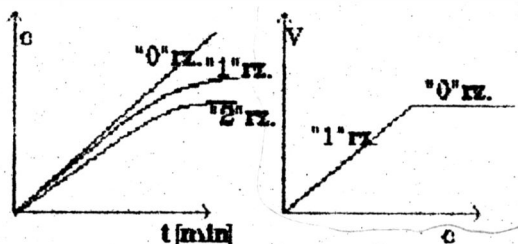
Gdy szybkość reakcji nie zależy od stężenia substratu, a jest określana przez jakiś inny czynnik mamy do czynienia z REAKCJĄ ZEROWEGO RZEDU. Równanie różniczkowe wyrażające tę reakcję ma postać:

$$\frac{dx}{dt} = k$$

W przypadku reakcji enzymatycznej

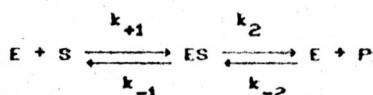
$$\frac{dx}{dt} = k[E]$$

Szybkość początkowa reakcji jest niezależna od rzędu reakcji. Po-
daje ona przyrost produktów jaki uzyskano by w dowolnym czasie, gdyby
stężenie substratu nie ulegało zmianie i było równe stężeniu początko-
wemu



7.7.2 WPŁYW STĘŻENIA SUBSTRATU

Przy stałym stężeniu enzymu, a przy zmieniającym się stężeniu (wzroście) substratu szybkość reakcji rośnie i osiąga wartość maksymalną.



$k_1, \dots, \dots =$ stałe szybkości

$$v_1 = k_{+1} [E][S]$$

$$v_2 = k_{-1} [ES]$$

$$v_3 = k_{+2} [ES]$$

$$v_4 = k_{-2} [E][P]$$

Kompleks [ES] tworzy się z szybkością $v_1 + v_4$, a rozkłada z szybkością $v_2 + v_3$.

W stanie równowagi:

$$v_1 + v_4 = v_2 + v_3$$

Na początku reakcji stężenie produktu [P] jest tak małe, że możemy je pominąć.

Szybkość reakcji zależy od stężenia kompleksu [ES] i szybkości jego rozkładu.

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

Stała równowagi układu wynosi:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+2}} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (1)$$

i ma nazwę **STAŁEJ MICHAELISA - MENTEN**

Po przekształceniu równania można wyznaczyć stężenie kompleksu ES w stanie równowagi dynamicznej rozwiązując równanie względem [ES]

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Ponieważ początkowa szybkość reakcji enzymatycznej V jest proporcjonalna do stężenia kompleksu ES możemy zapisać $v = k_2[ES]$ (3)

Jeżeli stężenie substratu jest tak wysokie, że wszystkie czasteczki enzymu w układzie występują w postaci kompleksu [ES], to zostaje osiągnięta szybkość maksymalna V_{max} zgodnie z wyrażeniem

$$V_{max} = k_2 [E] \quad (4)$$

w którym [E] jest całkowitym stężeniem enzymu. Jeżeli zastąpimy wyrażenie [ES] w równaniu 3 jego wartość z równania 2

$$v = k_2 \frac{[E][S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

Dzieląc to równanie przez równanie 4 otrzymujemy

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{k_2 \frac{[E][S]}{K_M + [S]}}{k_2 [E]} \quad (6)$$

rozwiązując je względem V uzyskamy

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

Jest to **RÓWNIANIE MICHAELISA-MENTEN** określa ono ilościową zależność między szybkością reakcji enzymatycznej a stężeniem substratu, jeżeli znane są wartości V_{max} i K_M

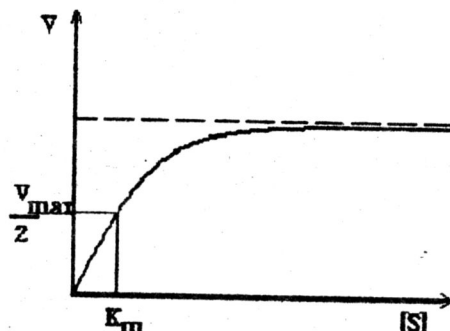
Równanie to można napisać w postaci $(V_{\max} - V)/K_M + [S] = V_{\max} \cdot K_M$.
Przy niewielkich stężeniach substratu, kiedy $[S]$ jest znacznie mniejsze niż K_M , $V = [S] \cdot V_{\max} / K_M$; oznacza to, że szybkość reakcji jest wprost proporcjonalna do stężenia substratu.

Przy dużych stężeniach substratu, kiedy $[S]$ jest dużo większe od K_M , $V = V_{\max}$, co oznacza, że szybkość jest maksymalna, niezależna od stężenia substratu. Znaczenie K_M wynika z równania (7), kiedy $[S] = K_M$

wtedy

$$V = \frac{V_{\max}}{2} \quad (8)$$

Stąd K_M jest równe stężeniu substratu (w mol/l), dla którego szybkość reakcji osiąga połowę szybkości maksymalnej (przy stałym stężeniu enzymu).



Podana metoda oznaczania K_M jest kłopotliwa i nie daje często odpowiedzi czy została osiągnięta szybkość maksymalna ($V_{\max}$). Sporządza się więc zazwyczaj wykres wg. równania **LINEWEAVERA-BURKA** które jest przekształceniem wzoru Michaelisa-Menten do postaci liniowej.

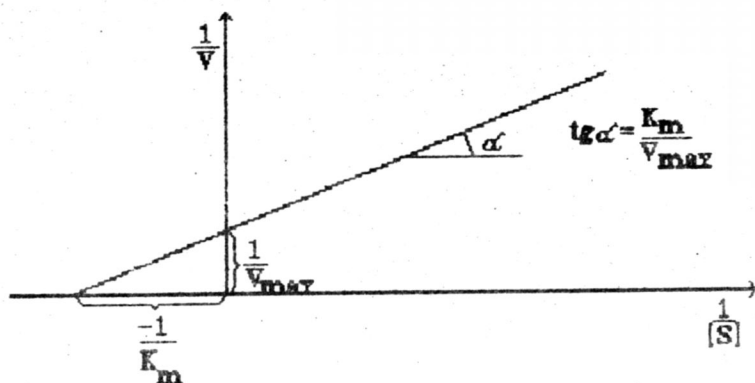
$$\frac{1}{V} = \left(1 + \frac{K_M}{[S]}\right) : V_{\max}$$

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{K_M}{[S]} \right) \cdot \frac{1}{v_{\max}}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (9)$$

Wartość $K_{M/V \max}$ (a) i $1/V_{\max}$ (b) są wielkościami stałymi, stąd zależność $1/V$ od $1/[S]$ jest LINIA PROSTA.



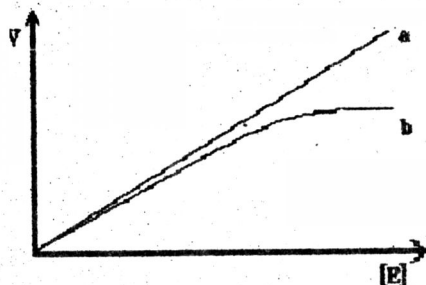
W układzie współrzędnych wartość $1/V$ odkłada się na osi rzędnych, a wartość $1/[S]$ na osi odciętych. Wówczas równanie (9) daje linię prostą której nachylenie określa się jako stosunek $K_M/V_{\max}$, która przecina oś rzędnych w punkcie wyznaczającym $1/V_{\max}$, a oś odciętych w punkcie $-1/K_M$.

ENZYMY - BUDOWA, JEDNOSTKI, KINETYKA

7.7.3. WPŁYW STĘŻENIA ENZYMU

Szybkość reakcji zależy od stężenia enzymu tylko wtedy, gdy stężenie substratu znajduje się w nadmiarze.

Szybkość reakcji jest wówczas proporcjonalna do stężenia enzymu $[E]$ i stałej szybkości reakcji K : $V_{\max} = K [E]$. Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji przy 2 różnych stężeniach substratu:



a) Enzym wysycony substratem

b) Enzym nie wysycony substratem

7.7.4. WPŁYW NADMIARU PRODUKTÓW LUB SUBSTRATÓW

Nadmiar substratów może być czynnikiem hamującym. Jeśli stężenie enzymu jest stałe, to ze wzrostem stężenia substratu rośnie szybkość, aż do szybkości granicznej. Przy dalszym zwiększeniu stężenia substratu, szybkość jego przemiany może się obniżać. Przy pewnym stężeniu substratu cała powierzchnia czynna enzymu jest nim wysyciona i dalsze zwiększenie stężenia substratu nie wpływa na przyspieszenie procesu. odwrotnie nadmierne ilości substratu mogą utrudniać odpływ produktów reakcji.

Nadmierne nagromadzenie się produktów reakcji może być nie tylko czynnikiem hamującym, ale czynnikiem kontrolującym jej przebieg.

Szczególnie ma to miejsce gdy produkt jednej reakcji jest substratem dla następnej reakcji. Wówczas następuje samoregulacja całego szeregu procesów, uzależniona zapotrzebowaniem na produkt końcowy, bądź któryś z pośrednich produktów reakcji.

4. WPŁYW TEMPERATURY

Ze wzrostem temperatury zwiększa się szybkość reakcji enzymatycznej. Po osiągnięciu pewnego optimum w danych warunkach szybkość reakcji zaczyna opadać w następstwie denaturacji cieplnej enzymu.

Większość enzymów traci niedwracalnie aktywność po przekroczeniu temperatury 65°. W zakresie temperatur, w których denaturacja enzymu jest praktycznie nieistotna, a więc do około 37°C, podniesienie temperatury o 10°C zwiększa szybkość reakcji około 2 - krotnie (Q_{10}).

Zależność pomiędzy szybkością reakcji i temperaturą określa RÓWNA-NIE ARRHENIUSA Wyraża ono energię aktywacji określoną na podstawie różnych prędkości reakcji w różnych temperaturach.

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2}$$

$$2,303 \cdot \lg \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2}$$

$$\text{stad } E_a = \frac{2,303 \lg \frac{k_2}{k_1} \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1}$$

gdzie k_1 i k_2 - stałe szybkości reakcji w temp. T_1 i T_2
 E_a - energia aktywacji w J/mol
 R - stała gazowa = 8,319 J/(mol × K)
 T_1 i T_2 - temperatura pomiarów w skali Kelvina

Stężenie enzymu jest stałe podczas przebiegu reakcji w dwóch różnych temperaturach, zmiany w szybkości reakcji zależą od zmian wartości k . zamiast więc wartości stałych k_1 i k_2 wyznacza się dwie szybkości maksymalne dla dwóch różnych temperatur: $V_{1\max}$ i $V_{2\max}$.

7.7.6. WPŁYW PH

Czynnikiem silnie wpływającym na aktywność enzymu jest stężenie jonów wodorowych. Przebieg krzywej wyrażającej wpływ pH na działanie enzymu zależy od wielu czynników:

- 1/ Zmiana pH środowiska zmienia stan zjonizowania grup czynnych i ładunek całej cząsteczki białka.
- 2/ Jeżeli substrat jest obdarzony ładunkiem, to powinowactwo jego różnych form jonowych do enzymu będzie inne.
- 3/ Przekształcenie kompleksu enzym-substrat i kompleksu enzym-produkt może zachodzić tylko przy określonym stanie zjonizowania kompleksu.
- 4/ W niektórych reakcjach enzymatycznych jony wodorowe lub wodorotlenowe mogą bezpośrednio uczestniczyć w reakcji - zwłaszcza w reakcjach oksydacyjno-redukcyjnych.
- 5/ pH wywiera wpływ na stabilność enzymu; szybkość denaturacji i inaktywacji enzymu zależy od pH.

Dla każdego enzymu istnieje optymalne dla jego działania pH np. dla PEPSYNY pH 2; DEKARBOKSYLAZY GLUTAMINOWEJ pH 6; a α -AMYLASY SLIMOWEJ pH około 7.

7.7.7. WPŁYW AKTYWATORÓW

Różnego rodzaju aktywatory nie biorące udziału w reakcji katalitycznej uczynniają enzymy lub zwiększają ich aktywność. MOŻNA JE UJĄC W 3 GRUPY:

ENZYMY - AKTYWATORY I INHIBITORY

A/ JONY NIEKTÓRYCH METALI NAJCZĘŚCIEJ DWUWARTOŚCIOWYCH

Dla niektórych enzymów metale są niezbędne dla wytworzenia wiązania między enzymem a substratem lub między enzymem, koenzymem i substratem. W innych enzymach metal stanowi istotną część składową centrum katalitycznego enzymu, który bez niego jest nieczynny. Jest to typowa funkcja metalu jako koenzymu np. w enzymach przenoszących elektrony. Enzymy są aktywne przez jony: Mg^{+2} (fosforylasy, fosfatazy, fosfokinazy, syntetazy), Zn^{+2} (anhydraza węglanowa, dipeptydaza glicylo-leucynowa, dehydrogenaza mleczanowa, dehydrogenaza alkoholowa oraz proteazy), Mn^{+2} (peptydazy, arginaza), Ca^{+2} (lipazy, dehydrogenaza bursztynianowa, niektóre proteazy), Cu^{+2} (oksydazy).

ANIONY mają mały wpływ na aktywność enzymów. Wyjątkiem jest α -AMYLAZA SLINOWA aktywowana jonami chlorkowymi.

B/ ZWIĄZKI WIELKOCZĄSTECZKOWE O CHARAKTERZE BIAŁKOWYM

Działające przez odmaskowanie grup czynnych enzymu (patrz wyżej preenzymy).

C/ DROBNOCZĄSTECZKOWE POŁĄCZENIA ORGANICZNE

Usuwanie wpływu związków inhibujących np. utlenianie grup $-SH$ enzymu bardzo często prowadzi do utraty jego aktywności. Odtwarza je dodanie CYSTEINY, ZREDUKOWANEGO GLUTATIONU CZY MERKAPTOETANOLU. wskutek redukcji ugrupowania $-S-S-$ do $-SH$.

Podkreślić należy, że aktywacja enzymu poprzez odpowiedni aktywator jest procesem zupełnie różnym od aktywacji substratu przez czynny enzym, która polega na jego połączeniu z centrum katalitycznym enzymu.

7.7.8. WPŁYW INHIBITORÓW

INHIBITORAMI ENZYMÓW NAZYWAMY TAKIE SUBSTANCJE, KTÓRE OBNIŻAJĄ CZY TEŻ CAŁKOWICIE ZNOSZĄ ICH AKTYWNOŚĆ.

ENZYMY - AKTYWATORY I INHIBITORY

Jednym z czynników regulacji reakcji enzymatycznych jest zjawisko hamowania enzymów pod wpływem swoistych składników komórkowych.

Z uwagi na fakt, że pod względem odwracalności zjawisko to może mieć dwojaki charakter, wyróżnia się odpowiednio dwa typy inhibicji enzymów; tj. typ **NIEODWRACALNY** i **ODWRACALNY**.

Inhibicja NIEODWRACALNA polega zazwyczaj na destrukcji lub modyfikacji jednej lub kilku grup funkcyjnych enzymu.

Natomiast **inhibicje ODWRACALNE** można ilościowo analizować zgodnie z założeniem Michaelisa - Menten. Znale są dwa główne typy inhibicji odwracalnej: inhibicja **KOMPETYCYJNA** i **NIEKOMPETYCYJNA**.

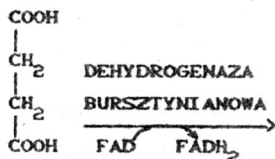
Odwroćenie, czyli cofnięcie inhibicji kompetycyjnej można osiągnąć zwiększając stężenie substratu, podczas gdy w wypadku inhibicji niekompetycyjnej stężenie substratu nie wywiera wpływu na szybkość reakcji.

A/ INHIBICJA KOMPETYCYJNA

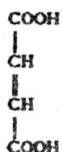
Inhibitory KOMPETYCYJNE wykazują analogie strukturalne do substratu i konkurują z nim o centrum katalityczne enzymu, spowodowane brakiem absolutnej specyficzności grup czynnych tego centrum w stosunku do substratu.

Innymi słowy, wiązanie substratu i inhibitora kompetycyjnego wzajemnie się wykluczają. Inhibitor kompetycyjny zmniejsza szybkość katalizy przez zmniejszanie liczby cząstek enzymu, wiążących substrat.

Przykładem jest hamowanie dehydrogenazy bursztynianowej przez kwas malonowy. Dehydrogenaza ta przekształca kwas bursztynowy w kwas fumarowy w myśl reakcji:



Kw. bursztynowy



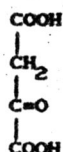
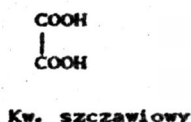
Kw. fumarowy

INHIBITORY DEHYDROGENAZY



Kw. malonowy

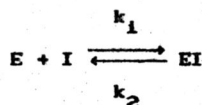
ENZYMY - AKTYWATORY I INHIBITORY



Poza malonianem, jako inhibitory kompetycyjne dehydrogenazy burztynianowej mogą również działać inne dwukarboksylowe kwasy, w których istnieje odpowiednia odległość pomiędzy obydwoma grupami anionowymi.

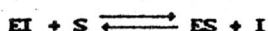
Przykład fizjologicznie ważnej inhibicji kompetycyjnej występuje w reakcji tworzenia 2,3-difosfoglicerynianu (2,3-DPG) z 1,3-difosfoglicerynianu. DIFOSFOGLICEROMUTAZA, enzym katalizujący tę reakcję izomeryzacji, podlega inhibicji kompetycyjnej przez 2,3-DPG nawet przy małym jego stężeniu.

Analizując wyżej przedstawione przykłady i wiele innych wynioskowano, że inhibitor kompetycyjny (I) reaguje odwracalnie z enzymem (E) w miejscu właściwym dla wiązania substratu dając kompleks EI.



$$K_i = \frac{k_2}{k_1}$$

$$K_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]}$$

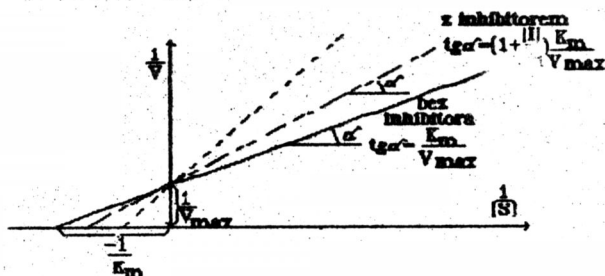


Gdzie $[\text{I}]$ - stężeniem inhibitora, a K_i stałą dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor.

Kompetycyjny charakter inhibicji najłatwiej stwierdzić stosując wykres Lineweavera-Burka tj. odkładając wartości $\frac{1}{V}$ do $\frac{1}{\text{ESI}}$ przy

ENZYMY - AKTYWATORY I INHIBITORY

zmiennych stężeniach inhibitora. Uzyskuje się wówczas na wykresie linie proste o różnym nachyleniu, które krzyżują się we wspólnym miejscu przecięcia osi $1/v_{max}$.



Innymi słowy w obecności inhibitora kompetycyjnego nie ulega zmianie v_{max} ; bez względu bowiem na stężenie inhibitora, można zawsze dobrać odpowiednio wysokie stężenie substratu, przy którym aktywność enzymu może być w pełni przywrócona.

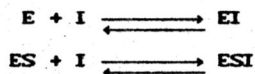
W obecności inhibitora kompetycyjnego kinetykę enzymu opisuje równanie:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \left(\frac{1}{[S]}\right)$$

W obecności inhibitora kompetycyjnego nachylenie wykresu zwiększa się o czynnik $(1 + [I]/K_i)$

B/ INHIBICJA NIEKOMPETYCYJNA

W inhibicji NIEKOMPETYCYJNEJ inhibitor i substrat mogą jednocześnie wiązać się z cząsteczką enzymu. Inhibitor może wiązać się z wolnym enzymem lub kompleksem ES, bądź też z jednym i drugim.

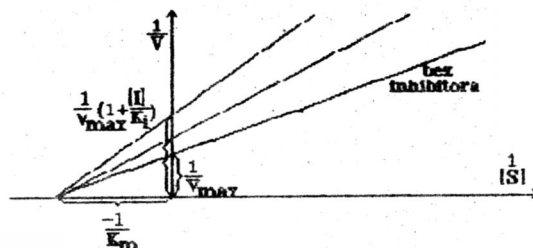


Oznacza to, że ich miejsca wiązania nie zachodzą na siebie. Zarówno forma EI jak i ESI są nieaktywne.

Niekompetycyjny charakter inhibicji można najłatwiej stwierdzić na podstawie wykresu Lineweavera-Burka dotyczącego zależności $1/v$ od $1/[S]$ przy różnych stężeniach inhibitora. W inhibicji niekompetycyjnej uzys-

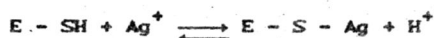
ENZYM - AKTYWATORY I INHIBITORY

kane proste różnią się nachyleniem, lecz nie przecinają osi $\frac{1}{V}$ we wspólnym punkcie.



Dla reakcji hamowanych, odpowiednie odcinki na osi $\frac{1}{V}$ stają się większe niż dla reakcji niehamowanej. Oznacza to, że w obecności inhibitora niekompetycyjnego wartość V_{max} ulega zmniejszeniu, bez względu na wysokość stosowanego stężenia substratu. Natomiast wartość K_m nie ulega zmianie w obecności inhibitora niekompetycyjnego.

Najczęstszym przypadkiem inhibicji niekompetycyjnej jest odwracalne wiązanie się niektórych odczynników z grupami -SH reszt cysteinowych, które mają istotne znaczenie dla aktywności katalitycznej niektórych enzymów. Zatem jony metali ciężkich (Cu^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2}) powodują inhibicję pewnych enzymów tworząc z ich grupami -SH merkaptidy; w reakcji tej szybko ustala się stan równowagi pomiędzy ilością enzymu w formie merkaptydowej i wolnymi jonami metalu.



W przypadku enzymów współdziałających z jonami metali, inhibicję niekompetycyjną mogą spowodować czynniki zdolne do wiązania się z tym niezbędnym dla enzymu metalem. Tak więc cyanki są inhibitorami enzymów zależnych od Fe^{+2} lub Fe^{+3} ; tworzą nieaktywne kompleksy podobne do żelazi- lub żelazocyanków. Czynniki chelatujące takie jak

etylenodiaminotetraoctan (EDTA) wiąże odwracalnie Mg^{+2} i inne kationy dwuwartościowe, hamując w ten sposób enzymy, dla których te jony są niezbędne.

C/ INHIBICJA NIEODWRACALNA

INHIBICJE: kompetycyjna i niekompetycyjna podlegają zależności Michaelisa - Mentena, ponieważ przyjmuje się, że inhibitor łączy się odwracalnie z enzymem.

Zależność Michaelisa-Mentena nie może być stosowana w odniesieniu do inhibicji nieodwracalnej.

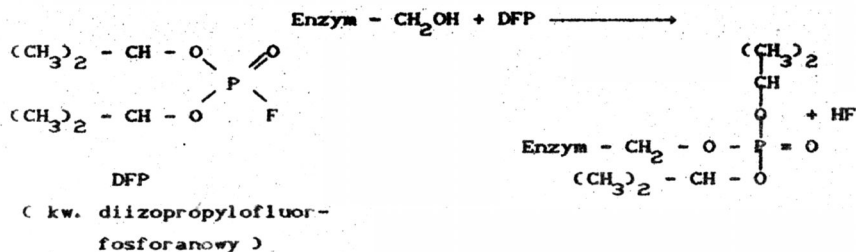
Działanie niektórych inhibitorów tego typu polega na "uszkodzeniu" cząsteczki enzymu w wyniku chemicznej modyfikacji jej struktury. Tak zmodyfikowany enzym jest jeszcze aktywny, ale szybkość jego działania ulega zmniejszeniu.

Jednym z dobrze poznanych przykładów inhibicji nieodwracalnej jest inhibicja powodowana przez czynniki alkilujące jak np. JODOACETOAMID, który może nieodwracalnie wiązać niezbędne dla aktywności enzymu grupy -SH.



Innym nieodwracalnie działającym inhibitorem jest diizopropylodifluorofosforan, oznaczany w skrócie DFP. Inhibitor ten należy do grupy toksycznych związków fosforoorganicznych, zwanych często truciznami układu nerwowego, ponieważ łącząc się z esterazą acetylocholinową inaktywują ten enzym uczestniczący w funkcjonowaniu centralnego układu nerwowego. (Niektóre ze związków fosforoorganicznych stosowane są jako insektycydy). DFP jest inhibitorem nie tylko esterazy cholinowej, ale również innych enzymów zawierających w centrum aktywnym resztę serynową; inhibitor ten łączy się z grupą hydroksylową seryny tworząc kowalencyjną pochodną enzymu.

ENZYMY - AKTYWATORY I INHIBITORY



ENZYMAМИ ZAWIERAJACYMI w centrum aktywnym serynę i inhibowanymi przez DFP są poza cholinesterazą: trypsyna, chymotrypsyna, trombina, psikreatopeptydaza E, fosfoglukomutaza, fosforylaza. Inhibicja powodowana przez DFP jest nieodwracalna, gdyż powstająca pochodna trzeciozestawowego estru fosforanowego jest związkiem trwałym i nie ulega łatwo hydrolizie.

D/ INHIBICJA ALLOSTERYCZNA

ENZYMY OLIGOMERYCZNE (zbudowane z podjednostek) oprócz centrum katalitycznego wiążącego substrat, mają także centra allosteryczne - miejsca wiążące efekторы dodatnie lub ujemne. **Efektor ujemny** po przyłączeniu do centrum allosterycznego wywołuje zmianę struktury cząsteczki, ograniczając dostęp substratu do centrum katalitycznego. Wyraża się to w zmniejszeniu powinowactwa enzymu do substratu.

Efektor dodatni przyłączony do centrum regulacyjnego powoduje zmiany w strukturze cząsteczki enzymu ułatwiające dostęp substratu do centrum katalitycznego, a manifestuje się to wzrostem powinowactwa enzymu do substratu.

7.8. LOKALIZACJA ENZYMÓW W ORGANELLACH KOMÓRKOWYCH

1. JADRO KOMÓRKOWE I JADERKO

- Polimeraza DNA
- Polimeraza RNA, DNA zależna
- Ligazy
- Endonukleazy

2. MITOCHONDRIA

- Syntetazy acylo-CoA
- Kinaza adenylowa
- Dehydrogenaza α -ketokwasow
- Syntetaza cytrynianowa
- Dehydrogenaza jablczanowa
- Hydrataza cis-akonitanowa
- Dehydrogenaza glutaminianowa

3. LIZOSOMY

- Fosfataza kwasna
- β -glukuronidaza
- RNA-aza
- DNA-aza
- Katepsyny
- Sulfataza

4. CYTOPLAZMA

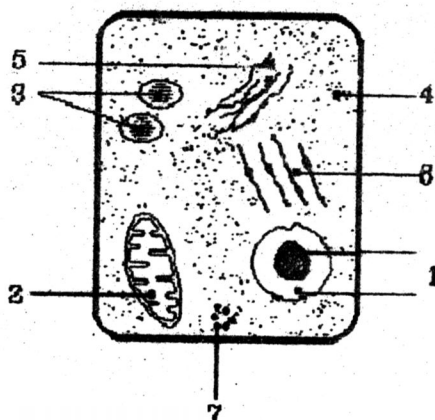
- Aminotransferaza AspAT i AlAT
- Dehydrogenaza mleczanowa
- Aldolaza 1,6-difosfruktozowa
- Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
- Dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa
- Transferaza malonylowa
- Karboksylaza acetylo-CoA
- Dezaminaza adenozyiny

5. APARAT GOLDIEGO

- Pirofosfataza tiaminowa
- Enzymy syntetyzujace mukopolisacharydy i glikoproteiny

6. SIATECZKA ENDOPLAZMATYCZNA

- Tiolaza
- Kinaza mewalonianowa
- Syntetaza geranylopirofosforanowa
- Syntetaza farnezylopirofosforanowa



ENZYMY SUROWICY KRWI

- Syntetaza skwalenowa
- Acetylotransferaza monoacyloglicerynowa
- Transferaza peptydylowa
- Translokaza

7. **PEROKSYZOMY**

- Oksydaza moczanowa
- Oksydaza L i D aminokwasów
- Katalaza

Poszczególne enzymy są ściśle związane z określonymi strukturami, z którymi tworzą morfologiczno - funkcjonalną całość. Niektóre enzymy występują jednocześnie w różnych strukturach komórkowych. Wiele z nich wykrywa się w surowicy krwi, co jest spowodowane przepuszczalnością błon pewnych komórek dla enzymów lub ich uwalnianiem z komórek obumierających. W pewnych chorobach aktywność enzymów surowicy zwiększa się z powodu uszkodzenia lub martwicy komórek, zwiększenia stężenia białka enzymatycznego w tkankach (nowotwory) lub upośledzonego wydalania enzymów przez nerki albo wątrobę.

7.9. ENZYMY SUROWICY KRWI

7.9.1. ENZYMY SEKRECYJNE

Enzymy sekrecyjne są syntetyzowane głównie w wątrobie, a następnie wydzielane do krwi. Normalnie obecne są w surowicy krwi, ich brak świadczy o zaburzeniach syntezy białka. Do tej grupy należą m.in.: **ESTERAZA CHOLINOWA** (ChE), **CERULOPLAZMINA** (Crpl), **PLAZMINOGEN** (Pg), **CZYNNIKI KRZEPNIĘCIA** (CF).

7.9.2. ENZYMY WSKAŹNIKOWE

Enzymy wskaźnikowe (indykatorowe) nie występują w prawidłowej surowicy krwi lub aktywność ich jest nie wielka. Przy uszkodzeniu komórek dostają się do krwi, co wskazuje na zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych lub martwicę komórek. Enzymy tej grupy mogą być :

ENZYMY SUROWICY KRWI

a/ **NARZĄDOWO SWOISTE** np. dla wątroby enzymy cyklu mocznikowego: TRANSFERAZA ORNITYNO - KARBAMYLOWA (OCT), ARGINAZA (ARG), poza tym: DEHYDROGENAZA ALKOHOLOWA (ADH), DEHYDROGENAZA SORBITOLOWA (SDH), ALDOLAZA FRUKTOZO-1-FOSFORANOWA (FMPA) oraz ALDOLAZA FRUKTOZO-1,6-DIFOSFORANOWA (FDPa).

b/ **NARZĄDOWO NIESPECYFICZNE**

np. enzymy cyklu glikolitycznego: HEKSOKINAZA (HK), FOSFOHEKSOIZOMERAZA (PHI), KINAZA PIROGRONIANOWA (PK), DEHYDROGENAZA MLECZANOWA (LDH). Enzymy cyklu Krebsa: DEHYDROGENAZA IZOCYTRYNIANOWA (ICD), DEHYDROGENAZA JABŁCZANOWA (MDH), FUMARAZA = HYDRATAZA FUMARANOWA (FUM).

Enzymy cyklu pentozy-fosforanowego: DEHYDROGENAZA GLUKOZO-6-FOSFORANOWA (G-6-PDH); TRANSKETOLAZA (TK). Poza tym enzymy przemiany białkowej: AMINOTRANSFERAZA ASPARAGINIANOWA (AspAT), AMINOTRANSFERAZA ALANINOWA (AlAT), DEHYDROGENAZA GLUTAMINIANOWA (GLDH); AMINOPEPTYDAZA LEUCYNOWA (LAP), γ -GLUTAMYLTRANSPEPTYDAZA (GGTP).

Enzymy przemiany purynowej: DEZAMINAZA ADENOZYNOWA (ADA) GUANAZA (GH), OKSYDAZA KSANTYNOWA (OX).

7.9.3. ENZYMY EKSKRECYJNE

Enzymy ekskrecyjne prawidłowo występują w niewielkich ilościach w surowicy krwi. Są to enzymy wydalone z ustroju w różnych wydzielinach (trzustki, gruczołu krokowego), a we krwi pojawiające się w razie przeszkód w odpływie np. żółci, soku trzustkowego, wydzieliny gruczołu krokowego.

W enzymologicznej diagnostyce laboratoryjnej wykorzystuje się również obraz izoenzymograficzny. Na podstawie zachowania się IZOENZYMÓW można określić rodzaj uszkodzonego narządu lub wykluczyć istnienie tego uszkodzenia.

ENZYMY - AKTYWNOŚCI PRAWIDŁOWE

7.9.4. PRAWIDŁOWE WARTOŚCI AKTYWNOŚCI NIEKTÓRYCH ENZYMÓW OSOCZA (SUROWICY) KRWI W U/L. NKAT/L

(cyt. za Pawelski s., May S.: "Normy i kliniczna interpretacja badań diagnostycznych w medycynie wewnętrznej" PZWL, Warszawa. 1981r. str.169)

NUMER E.C.	NAZWA POTOCZNA enzymu (skrot)	WARTOŚCI PRAWIDŁOWE nkat/l; U/l	WARTOŚCI NIEPRAWIDŁOWE P: podwyższone, O: obniżone
1.1.1.8.	Dehydrogenaza gliceryno-3-fosforanowa (GDH)	2,7 (1,6-6,6) 45 (27-110)	P: ostre zapalenie wątroby (wirusowe i toksyczne)
1.2.1.12	Dehydrogenaza gliceraldehydofosforanowa	4,3 (0,2-4,0) 70 (3-67)	P: ostre zapalenie wątroby
1.1.1.27	Dehydrogenaza mleczanowa (LDH)	140 ⁺ 20 (70-360) 2300 ⁺ 300 (1100-5000)	P: zawał mięśnia sercowego LDH-1, LDH-2, ostre zapalenie wątroby (LDH-4, LDH-5), przewlekłe zapalenie wątroby (LDH-1, LDH-5) marskość wątroby (LDH-3), zawał płuc (LDH-5), niedokrwistość hemolityczna i megaloblastyczna, mononukleoza zakaźna, czerwienica prawdziwa osteomielosklerozą, dystrofia mięśniowa, nowotwory złośliwe (LDH-3), zapalenie kłębkowe nerek, zatrucia alkoholowe
	Dehydrogenaza α-hydroksymaslanowa (HBDH)	77 - 36 1300 ⁺ 600	P: zawał mięśnia serca, niedokrwistość megaloblastyczna, niedokrwistości hemolityczne, ostre białaczki, nowotwory złośliwe, postępująca dystrofia mięśniowa

ENZYMY - AKTYWNOŚCI PRAWIDŁOWE

1.1.1.14	Dehydrogenaza sorbitolowa (SDHD)	0,08 (0-3,0) 2 (0-50)	P: ostre zapalenie wątroby (wirusowe, toksyczne) uszkodzenie wątroby
1.1.1.49	Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G-6-PG)	1,4 (0,5-2,5) 23 (8-40)	P: zawał mięśnia serca O: schizofrenia
1.1.1.44	Dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa (6-PGD)	2,5-1,0 (0,7-4,0) 40 ⁺ 20 (20-70)	P: wirusowe zapalenie wątroby, przerzuty raka do wątroby, niedokrwistości megaloblastyczne
1.1.1.42	Dehydrogenaza izocytrynianowa (ICDH)	3,5 (1,0-8,0) 60 (20-140)	P: wirusowe zapalenie wątroby, marskość wątroby, przerzuty raka do wątroby, zatrucie ciążowe
1.1.1.37	Dehydrogenaza jabłczanowa (MDHD)	24,0 ⁺ 4,0 400-60 (200-800)	P: zapalenie wątroby, nadczynność tarczycy, zawał serca, zapalenie mięśni
1.2.1.12	Dehydrogenaza triozofosforanowa (GAPDH)	7,1 (1,0-11,2) 120 (20-200)	P: ostre zapalenie wątroby, mononukleoz, nowotwory
1.2.3.2	Oksydaza ksantynowa	0,0005 0,2 pkt	P: uszkodzenie wątroby
1.6.4.2	Reduktaza glutationowa (GR)	19 ⁺ 7 (5-35) 310 ⁺ 110 (80-600)	P: ostre zapalenie wątroby, nowotwory, białaczki, niedokrwistość hemolityczna, marskość wątroby
1.4.1.3	Dehydrogenaza glutationowa (GLDH)	1,0 (0,5-1,5) 17 (8-25)	P: ostre wirusowe zapalenie wątroby, żółtaczka zastoinowa, marskość wątroby, dystrofia mięśni

ENZYMY - AKTYWNOŚCI PRAWIDŁOWE

	Ceruloplazmina	20-45 330-750	P: ciąża, praca fizyczna, ostre zapalenie wątroby, marskość wątroby, nowotwory, choroby zakaźne, białaczki, ziarnica złośliwa, choroba Parkinsona, cukrzyca, niedokrwistość z niedoboru żelaza, zawał serca, schizofrenia O: choroba Wilsona, zespół nerczycowy, sprue, kwashiorkor
2.1.3.3	Karbamilo-transferaza ornitynowa (OCT)	0-0,4 0-7	P: wirusowe zapalenie wątroby, żółtaczkę mechaniczną, rak wątroby, zawał serca, zabiegi operacyjne, radioterapia, ciąża, wysiłek fizyczny
2.2.1.1	Transketolaza	0,3 (0,17-0,6) 5 (3-10)	P: zapalenie wątroby ostre, mocznica, białaczka, zapalenie płuc
	γ -glutamylotranspetydaza (GGTP)	2,55 ⁺ 1,2 (2,0-7,5) 42 ⁺ 20 (30-125)	P: żółtaczkę mechaniczną, nowotwory pierwotne i przerzutowe wątroby, wirusowe zapalenie wątroby, przewlekłe zapalenie wątroby, marskość wątroby, zawał serca, alkoholizm

ENZYMY - AKTYWNOŚCI PRAWIDŁOWE

2.6.1.1	Aminotransferaza asparaginowa (AspAT)	12,0 (6,0-22,0) 200 (100-350)	P: zawał serca, zapalenie wątroby, hemoliza, ostre zapalenie trzustki, dystrofia mięśniowa
2.6.1.2	Aminotransferaza alaninowa (AlAT)	9,5 (3,0-18,0) 160 (50-280)	P: zapalenie wątroby, zawał serca
2.7.1.40	Kinaza pirogrogrianowa (PKO)	16,0 $\pm$ 6,0 (4,0-50,0) 250 $\pm$ 110 (60-830)	P: nowotwory O: ostre zapalenie wątroby
2.7.3.2	Kinaza kreatynowa (CKO)	1,0 $\pm$ 0,8 17 $\pm$ 13	P: zawał serca, wysięk fizyczny, zapalenie mięśni, dystrofie mięśniowe
2.7.2.3	Kinaza fosfoglicerynianowa (PGKO)	11,2 $\pm$ 3,1 180 $\pm$ 50	P: białaczki
2.7.4.3	Adenylokinaza miokinaza (MKO)	8,7 $\pm$ 3,1 165 $\pm$ 85	P: zawał serca, choroby mięśni
2.7.5.1	Fosfoglukomutaza (PGIM)	9,8 $\pm$ 5,2 165 $\pm$ 85	P: nowotwory, niedokrwistość megaloblastyczna, zatrucie tlenkiem węgla, choroby wątroby
3.1.1.8	Esteraza cholinowa (ChE)	3000 $\pm$ 500 (2500-5500) 50000 $\pm$ 8300 (41509-91500)	O: ostre zapalenie wątroby, postępująca marskość wątroby, przerzuty raka do wątroby, zatrucie owadobójczymi środkami organofosforowymi, niedożywienie,

ENZYMY - AKTYWNOŚCI PRAWIDŁOWE

			zawał serca, schizofrenia, niedokrwistość, wrodzony niedobór ChE, ciąża P: zespół nerczycowy, nadczynność tarczycy, cukrzyca z otyłością, myasthenia gravis, stany lekowe
3.1.1.7	Esteraza acetylocholinowa (AChE)	206 (130-310) 3500 (2100-5200)	
	Lipaza lipoproteidowa (CF)	10,1 180	O: wrodzony niedobór CF, miażdżyca
3.1.1.3	Lipaza trzustkowa (Lp)	78 ⁺ -29 1300 ⁺ -500	P: ostre zapalenie trzustki, rak trzustki, wrzód żołądka, niedrożność jelit, mocznica, krzywica, po podaniu morfiny
3.1.3.2	Fosfataza zasadowa (AP; FZ)	29 ⁺ -8 (25-92) 500 ⁺ -150 (400-100)	P: ciąża, krzywica, osteomalacja, choroba Pageta, choroba Recklinghausena, mięsak kości, przerzuty nowotworów gruczołu krokowego do kości, ostre zapalenie wątroby, marskość wątroby, żółtaczkę zastoinowe, zapalenie dróg żółciowych

ENZYMY - AKTYWNOŚCI PRAWIDŁOWE

			O: niedoczynnosc tarczycy, nerczyca, przedawkowanie wit. D, choroba trzewna, niedobor wit. C wrodzony niedobor, cięzkie toksyczne uszkodzenie watroby, dieta bogato bialkowa
3.1.3.2	Fosfataza kwasna (AcP; FK) calkowita oporna na formaldehyd hamowana przez winian	5,5 (90) 4,25 (70) 1,25 (20)	P: rak gruczolu krokowego z przerzutami do kości, nowotwory, zawal serca, zakrzepowe zapalenie zył, zapalenie watroby, marskosc watroby, choroba reumatyczna, choroba Gauchera, choroba Pageta O: leczenie estrogenami, kastracja
3.1.3.5	5'-nukleotydaza	7,9 (2-1,5) 130 (30-250)	P: zapalenie watroby ostre i przewlekłe, zolttaczka zastoinowa, rak watroby
3.1.3.9	Glukoza-6-fosfataza	8 133	P: ostre zapalenie watroby
3.1.6.1	Arylosulfataza	A 616 10300 B 122 2000	P: zapalenie trzustki, alkoholizm, kwashiorkor, mukopolisacharydoza I i III
3.2.1.1	α -amylaza (α -AM)	1500 ⁺ -615 ⁺ 25000-10000	P: ostre zapalenie trzustki, przyusznica

ENZYMY - AKTYWNOŚCI PRAWIDŁOWE

			wątroby, wyrostka robaczkowego, pęcherzyka żółciowego, niedrożność jelit, perforacja wrzodu trawiennego, po podaniu morfiny, sekrecyny, niewydolność nerek
3.2.1.30	N-acetylo- β -glukozamidynaza (NAGL)	4, 3-17, 2 70-300	P: marskość wątroby, ciąża
3.2.1.31	β -glukuronidaza (β -Gr)	M: $0,62 \pm 0,15$ 10 ± 3 8 ± 2 K: $0,46 \pm 0,12$	P: ciąża, ostre zapalenie wątroby, marskość wątroby O: niedokrwistość, białaczki, ciężkie postacie marskości wątroby
3.4.1.1	Leucyloamino-peptydaza (LAP)	1, 2-5, 4 20-90	P: żółtaczką zastoinową, marskość wątroby, ostre zapalenie trzustki, ciąża zwłaszcza mnoga
3.4.1.2	Aryloamidaza (AAp)	27, 0 (16-40) 450 (250-700)	P: zapalenie wątroby, nowotwory O: alkoholizm
	Angiotensynaza	8-18 130-300	P: wirusowe zapalenie wątroby, żółtaczką zastoinową, marskość wątroby, zapalenie kłębkowe nerek z nadciśnieniem tętniczym, zwężenie tętnicy nerkowej, ciąża, oporne na leczenie

ENZYM - AKTYWNOŚCI PRAWIDŁOWE

3.4.1.f	Pepsyna	$1,72^{+0,91}$ 30^{+15}	P: wrzód dwunastnicy O: resekcja żołądka, atrofia błony śluzowej żołądka
4.1.2.13	Aldolaza	1-6 10-100	P: postępująca dystrofia mięśniowa, ostre i przewlekłe zapalenie mięśni, zawał mięśnia serca, nowotwory, zapa- lenie trzustki, cukrzy- ca, nadczynność tarczy- cy, niedokrwistość me- galoblastyczna, ostre zapalenie wątroby
4.2.99.1 3.2.1. 35/36	Białuconidaza (HR)	$2,05^{+0,17} (?)$ 30^{+3}	P: przewlekłe zapalenie wątroby O: nowotwory, białaczki
5.3.1.9	Izomeraza hekso- zofosforanowa (PHF)	77^{+44} 1100^{+700}	P: ostre zapalenie wą- troby, białaczki szpi- kowe, nowotwory, dystro- fia mięśniowa, nerczy- ca, niedokrwistości me- galoblastyczne, zatrue- cie ciążowe, zapalenie trzustki, zapalenie dróg żółciowych
5.3.1.1	Izomeraza trio- zofosforanowa (TIM)	$42,8^{+15}$ 700^{+250}	P: białaczki, zawał serca i płuc, zapalenie trzu- stki, marskość wątro- by, zapalenie wątroby, postępująca dystrofia mięśniowa, nowotwory

ENZYMY - ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE

5.3.1.6	Izomeraza rybozo-fosforanowa	58 1000	P: mięsak chłonny, zapalenie kłębkowe nerek, zapalenie wątroby
4.2.1.11	Hydrataza fosfopirogronianowa	10,5 ⁺ 3,3 250 ⁺ 60	P: zawał serca, zapalenie wątroby, marskość wątroby, nowotwory

7.9.5. ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE POSZCZEGÓLNYCH ENZYMÓW

Oznaczenia enzymatyczne znalazły zastosowanie w diagnostyce chorób.

A/ CHOROBY WĄTROBY.

W ostrym zapaleniu wątroby dochodzi do wzrostu aktywności aminotransferaz (do 1000 U/l). Z reguły aktywność ALAT jest wtedy większa niż AspAT. Wskaźnik de Ritisa $\frac{AspAT}{ALAT}$ zmniejsza się do wartości poniżej jedności (najczęściej 0,6-0,2).

WZROST AKTYWNOŚCI ALAT - NAWET BEZ TOWARZYSZĄCEJ ŻÓŁTACZKI UPOWAŻNIA DO ROZPOZNANIA PROCESU CHOROBOWEGO TOCZĄCEGO SIĘ W WĄTROBIE. W przewlekłym zapaleniu wątroby aktywność aminotransferaz nie jest taka duża (do 200U/dm³) jak w ostrym zapaleniu. Równocześnie zmniejsza się aktywność esterazy cholinowej i stężenie białka całkowitego. W żółtaczkach zastoinowych aktywność aminotransferaz jest prawidłowa, natomiast stwierdza się WZROST AKTYWNOŚCI fosfatazy zasadowej (FZ), aminopeptydazy leucynowej (LAP), γ -glutamylotranspeptyazy (GGTP), dehydrogenazy glutaminianowej (GLDH). W żółtaczkach hemolitycznych zarówno aminotransferazy, jak i fosfataza zasadowa są prawidłowe, WZRASTA natomiast LDH.

We wrodzonym zapaleniu wątroby obserwuje się najwyższe aktywności dehydrogenazy glutaminianowej GLDH. Przy jednoczesnym oznaczaniu aktywności GLDH i transaminaz stosuje się współczynnik $\frac{ALAT + AspAT}{GLDH}$. Im jest on mniejszy tym większy jest stopień zniszczenia i martwicy tkanki wątrobowej.

ENZYMY - ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE

B/ CHOROBY SERCA

Czułym testem dla wykrycia zawału serca jest oznaczenie aktywności kinazy kreatyninowej (CPK) - pewnym ograniczeniem tego testu jest to, że jest on podwyższony tylko w 3 pierwszych dniach zawału.

W osoczu ludzkim występują trzy izoenzymy CPK: **MM**, **MB** i **BB**.

Przyjmuje się, że jedyną tkanką ludzką zawierającą izoenzym MB jest mięsień sercowy. W surowicy ludzkiej obecne są śladowe ilości izoenzymu MB; pojawienie się go w większej ilości uważane jest za pewny dowód na zawał mięśnia sercowego.

Gamma-glutamylotranspeptydaza (GGTP) w początkowym okresie zawału nie wykazuje zmian, wzrost aktywności obserwuje się dopiero począwszy od 4 dnia choroby. Maksimum aktywności, przekraczającej średnio pięciokrotne górne wartości spotykane u zdrowych, stwierdza się w 2-3 tygodniu choroby. Test ten jest czulszą próbą niż badanie aktywności **AspAT** której wzrost w zawale serca obserwuje się w 6-12 godz. od chwili dokonania się zawału, wartości szczytowe - przekraczające 2-15 razy wartości prawidłowe w 24-48 godz., a powraca do wartości prawidłowych w 4-7 dniu zawału. Test ten mimo braku swoistości narządowej należy do najczęstszych stosowanych w diagnostyce zawału serca, bo wraz z obserwacją kliniczną łatwo pozwala ustalić przyczyny wzrostu AspAT.

Oznaczanie aktywności **AlAT** jest mniej przydatne, gdyż aktywność wzrasta u mniejszego odsetka chorych. Szczyt aktywności obserwuje się w 3 dniu zawału, a do normy wraca po upływie 7 - 14 dni.

Wskaźówka może być współczynnik de Ritis'a, który w przypadku zawałów jest wyraźnie większy od 1,0.

W niewydolności krążenia wskutek niedotlenienia wątroby może dojść do równoczesnego zwiększenia AspAT i AlAT.

Aktywność **LDH** wzrasta w pierwszych 12 - 14 godz. zawału serca; osiąga szczyt w 2 - 4 dniu zawału i stopniowo powraca do normy w 8 - 14 dniu choroby. Jednak mała swoistość tego badania ogranicza jego wartość diagnostyczną. Aktywność LDH w surowicy ulega podwyższeniu nie tylko w zawale serca, lecz również w niewydolności krążenia, zapaleniu osierdza, w chorobach wątroby, mięśni, nerek, w nowotworach, chorobach krwi i po zabiegach kardiochirurgicznych.

ENZYMY - ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE

C/ CHOROBY TRZUSTKI

W ZAPALENIACH i w MARTWICY TRZUSTKI obserwuje się WZROST aktywności α -AMYLAZY w surowicy i moczu (ok. 40 razy). Wzrost ten można zaobserwować już w 3 do 6 godzin po wystąpieniu stanu zapalnego a maksimum osiąga po 20-30 godz. Stwierdza się również wzrost aktywności lipazy i proteaz.

D/ NOWOTWORY

Brak jest swoistego testu enzymatycznego, który pozwalałby na rozpoznanie nowotworu W RAKU GRUCZOŁU KROKOWEGO stwierdza się WZROST AKTYWNOŚCI FOSFATAZY KWAŚNEJ, hamowanej winianem tzw. frakcji stercozowej. Wartości są szczególnie duże przy przerzutach nowotworu do kości. Przerzuty do wątroby wywołują niewielkiego stopnia wzrost ALAT, LDH i FOSFATAZY ZASADOWEJ. Współczynnik $\frac{\text{AspAT} + \text{ALAT}}{\text{GLDH}}$ w przerzutach nowotworowych do wątroby jest szczególnie niski. Z kolei nowotwory wątroby charakteryzują się znacznym wzrostem aktywności AspAT, DEHYDROGENAZY GLUTAMINIANOWEJ (GLDH), FOSFATAZY ZASADOWEJ i LDH, która osiąga wartości powyżej 500 U/dm³.

E/ CHOROBY KRWI

W NIEDOKRWISTOŚCI ZŁOŚLIWEJ AKTYWNOŚĆ LDH osiąga 800-8000 U/dm³. W niedokrwistościach hemolitycznych wzrost LDH jest umiarkowany (70-1000 U/dm³). Ze względu na małą swoistość tego testu, stwierdzając dużą aktywność LDH należy wykluczyć obecność przerzutów nowotworowych (do 3000 U/dm³) zawału serca (od 1000 U/dm³), chorób wątroby (do 2000 U/dm³).

F/ CHOROBY MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

Szczególne ma oznaczanie aktywności CPK i ALDOLAZY W DYSTROFIACH MIĘŚNIOWYCH, np. typu Duchenna i ZAPALENIACH MIĘŚNI. Największe zmiany stwierdza się zawsze na początku choroby w jej ostrej fazie i okresach progresji.

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI

G/ ENZYMY W TOKSYKOLOGII

Różne fosforoorganiczne środki OWADO- i CHWASTOBOJCZE są silnymi truciznami także dla człowieka w związku z ich hamującym wpływem na esterazy, szczególnie esterazy cholinowe - (ChE). W przypadku zatrucia należy przede wszystkim oznaczyć aktywność ChE.

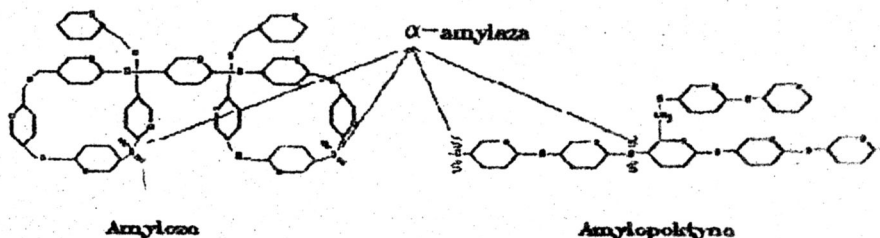
CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI HYDROLAZ

11 α -AMYLAZA (EC 3.2.11)

α -AMYLAZA należy do hydrolaz glikozydowych (KARBOKSYLAZ). Występuje w ślinie oraz w soku trzustkowym, stąd w czasie zastoju wydzieliny może resorbować się do krwi, a następnie przechodzić łatwo do moczu. α -AMYLAZA występująca w ślinie zwierzęcej posiada c.c.z. 45000. Optimum działania przypada na pH 6,0-7,0. Silnymi aktywatorami są jony CHLORKOWE natomiast inhibitorami jony: JODKOWY, CYTRYNIANOWY, SZCZAWIANOWY oraz EDTA.

WZROST aktywności amylazy we krwi wiąże się z ostrymi chorobami trzustki i ślinianek. W tych przypadkach również w moczu stwierdza się wzrost aktywności tego enzymu, zakres normy w surowicy wynosi 100-310 U/dm³, natomiast w moczu wartości prawidłowe sięgają 130-1500 U/dm³. Często są też stosowane jednostki WOHLGEMUTHA; jest to ilość α -AMYLAZY, KTÓRA W PRZECIAGU 30 MIN. W TEMP. 37°C ROZKŁADA 1 MG SKROBIL. Wartości prawidłowe dla surowicy wynoszą od 15-30 jed. WOHLGEMUTHA a dla moczu do 40 j.W., w soku trzustkowym 500-1500 j.W.



Rys. Działanie α -amylazy

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI



21

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI α -AMYLAZY W OSOCZU METODA WOLGHEMUTHA.

ZASADA METODY: α -amylaza hydrolizuje skrobię do produktu nie dającego reakcji barwnej z jodem. Stopień nierozłożenia skrobi oznacza się kolorymetrycznie za pomocą reakcji barwnej z jodem.

ODCZYNNIKI :

1. SUBSTRAT SKROBIOWY 0,5% - 0,5g skrobi cz.d.a. + 1g NaCl + 2g cytrynianu sodu + 95cm³ H₂O dest. - mieszaninę należy ogrzewać do wrzenia (gotować 5 min.). Po ochłodzeniu uzupełnić H₂O do 100 cm³ i przechowywać w lodówce (roztwór trwały przez dwa tygodnie).
2. 0,9% ROZTWÓR NaCl
3. ODCZYNNIK GRAMA - 2g KI + 1g jodu metalicznego rozpuścić w małej ilości H₂O dest. i następnie dopełnić H₂O dest. do 500 ml. (Bardzo trwały)

WYKONANIE OZNACZENIA :

PROBA WŁAŚCIWA - do próbki odmierzyć 2,4 cm³ substratu skrobiowego, a następnie dodać 0,1 cm³ osocza i inkubować mieszaninę przez 30 min. w temperaturze 37°C. Po inkubacji przejąć 0,25 cm³ roztworu inkubowanego do próbki zawierającej 9,5 cm³ H₂O dest. i 0,1 cm³ odczynnika Grama. Wymieszać dokładnie mieszaninę i dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali = 560 nm.

PROBA ODCZYNNIKOWA - postępujemy identycznie pomijając jedynie dodanie 0,1 cm³ osocza, dodając w to miejsce 0,1 cm³ H₂O.

OBLICZANIE WYNIKÓW :

Odczytu wartości absorbancji próby właściwej i odczynnikowej dokonujemy wobec wody

$$(\Lambda_{\text{próby odczynnikowej}} - \Lambda_{\text{próby właściwej}}) \times 200 = \text{aktywność amylazy w jedn. Wolghemutha (jW)}$$

Wartości prawidłowe dla osocza wynoszą 15-30 jW.

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI



22

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI α -AMYLAZY W MOCZU WG WINSŁOWA

ODCZYNNIKI :

- 0,9% ROZTWÓR NaCl
- 0,1% ROZTWÓR SKROBI
- ROZTWÓR I w KI

WYKONANIE: Do serii 10 małych probówek (numerowanych) dodać odczynniki zgodnie z zamieszczoną tabelką.

Do wszystkich probówek wlać po 1 cm^3 0,9% roztworu NaCl- pierwsza stanowi kontrolę. Do probówki nr 2 wlać 1 cm^3 moczu, wymieszać i pobrać z niej pipetą 1 cm^3 roztworu, przenieść do probówki nr 3 wymieszać, pobrać 1 cm^3 roztworu i przenieść do probówki nr 4 i. t. d., aż w końcu z ostatniej probówki pobrać 1 cm^3 i wylać do zlewu. W ten sposób każda probówka prócz probówki nr 1 (kontrola) zawiera połowę ilości moczu probówki poprzedniej. Teraz do każdej probówki dodać 2 cm^3 0,1% roztworu skrobi (jak łatwo obliczyć w każdej probówce znajduje się 2 mg skrobi). Wstawić probówki do łaźni wodnej na 30 minut (temp. 37°C). Po tym czasie do każdej probówki dodać 1 kroplę roztworu I w KI. Zabarwienie niebieskie po dodaniu jodu wskazuje na obecność nierozłożonej skrobi. Za podstawę obliczeń przyjmuje się tę najmniejszą ilość moczu, która w warunkach doświadczenia nie spowodowała powstania zabarwienia niebieskiego.

ODCZYNNIKI	Kolejne probówki i ilość dodanych cm^3									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NaCl 0,9%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Skrobia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Absolutna ilość mocz w cm^3	0	0,5	0,25	0,125	0,0625	itd.				
Rozcieńczenie	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512
30 minut w łaźni wodnej o temp. 37°C										
I w KI /krople	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ilość jednostek α -amylazy	0	4	8	16	32	64	28	56	512	1024

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI

Obliczenia: Jednostki α -amylazy oblicza się w dwojaki sposób:

1. Z ilości moczu w danej próbówce, wtedy

$$\frac{2}{\text{ilość użytych cm}^3 \text{ moczu}}$$

2. Z rozcieńczonego moczu - $2 \times$ rozcieńczenie

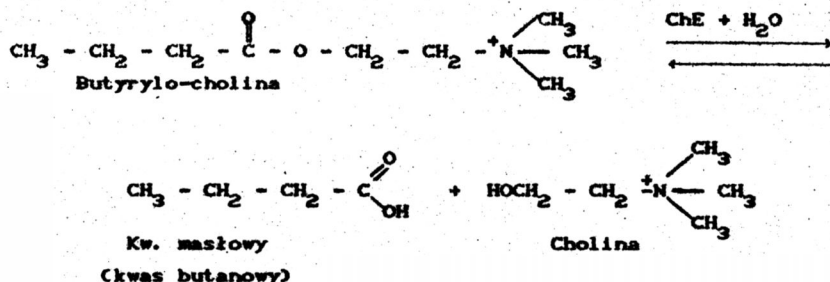
PRZYKŁAD: próbówka nr 5 zawiera najmniejszą ilość moczu nie wywołującą zabarwienia niebieskiego. W próbówce tej jest 0,0625 cm³ moczu

$$\frac{2}{0,0625} = 32 \text{ jednostki}$$

12. CHOLINOESTERAZY

Cholinoesterazy są to enzymy hydrolizujące estry CHOLINY. We krwi występują dwie cholinoesterazy. W SUROWICY jest PSEUDOCHOLINOESTERAZA (ChE; EC 3.1.1.8), zwana również cholinoesterazą niespecyficzną; butyrylo - bądź propionylocholinoesteraza. W KRWINKACH CZERWONYCH występuje acetylocholinoesteraza (AChE; EC 3.1.1.7) - CHOLINOESTERAZA PRAWDZIWA, która rozkłada przede wszystkim acetylocholinę. Inne estry cholicy rozkłada znacznie wolniej, ponieważ ma do nich mniejsze powinowactwo. ACETYLOCHOLINOESTERAZA występuje również w synapsach nerwowych; ruchowych i przywspółczulnych biorąc udział w prawidłowym przekazywaniu bodźców nerwowych. WZROST AKTYWNOŚCI CHOLINOESTERAZY obserwuje się w ostrym wirusowym zapaleniu wątroby, mniejszy w przewlekłym oraz w schorzeniach nerek. SPADEK AKTYWNOŚCI stwierdza się w marskości wątroby oraz w zawałach mięśnia sercowego. Porównanie aktywności cholinoesterazy i aminotransferaz w przebiegu zawału mięśnia sercowego jest wskaźnikiem prognostycznym. Wiele substancji - zwłaszcza leki np. PROSTYGMINA, FIZOSTYGMINA - działają jako inhibitory cholinoesterazy.

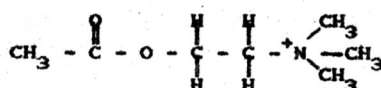
ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI



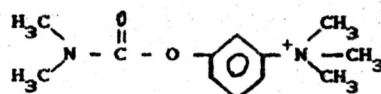
INHIBITORY ESTERAZ CHOLINOWYCH :

można podzielić na trzy grupy .

1. **LEKI BĘDĄCE ANALOGAMI STRUKTURALNYMI ACETYLOCHOLINY** działające jako odwracalne inhibitory kompetycyjne. Należą tu takie parasympatykomimetyki jak PROSTYGMINA, EZERYNA, MIOTYNA .

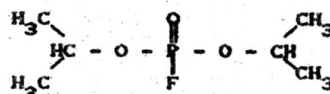


ACETYLOCHOLINA



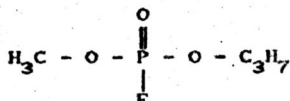
PROSTYGMINA

2. **ZWIĄZKI FOSFOROORGANICZNE** stosowane jako środki ochrony roślin (pestycydy, insektycydy) jak PARATION, DIIZOPROPYLOFLUOROFOSFORAN (DFP, DEP) i TETRAETILOPIROFOSFORAN (TEPP) .



DFP

3. **CHEMICZNE ZWIĄZKI BOJOWE** - TRUCIZNY UKŁADU NERWOWEGO typu trilonu, takie jak SOMAN, SARIN, TABUN



SARIN (Trilon 46)

Inhibitory z 2 i 3 grupy należą do nieodwracalnych inhibitorów nie-kompetycyjnych blokujących SERYNE w centrum katalitycznym enzymu, czym uniemożliwiają dostęp substratu. Po zablokowaniu dochodzi do zwiększenia stężenia acetylocholiny w synapsach cholinergicznym i zakończeniach nerwowych. Nagromadzenie acetylocholiny działa paraliżująco i wywołuje śmierć. Odblokowująco może działać PAM (jodek N-metylo-pirydynoaldoksymu).



23

OKREŚLANIE AKTYWNOŚCI PSEUDOCHOLINOESTERAZY METODĄ TESTU BIBUŁOWEGO.

WYKONANIE : Na bardzo czyste szkiełko podstawowe nanieść 1 kroplę nie-zhemolizowanej surowicy krwi. (Surowica winna być szybko po pobraniu krwi odciągnięta od krwinek, ponieważ zawarta w erytrocytach AChE może zawyżać wyniki). Połórką papierka testowego położyć na kropli surowicy i szybko nakryć szkiełkiem nakrywkowym, następnie poprzez kilkakrotne naciskanie szkiełka rozprowadzić surowicę równomiernie po papierku testowym.

Szkiełko nakrywkowe zmniejsza dopływ powietrza i jednocześnie zapobiega parowaniu. Moment kontaktu papierka testowego z surowicą jest początkiem testu.

ZASADA: Suchy czerwono-żółty papier testowy staje się przy zetknięciu z surowicą ciemno zielony, a następnie przyjmuje zabarwienie zielono-żółte, szaro-żółte aż do żółtego. Przebieg zmiany zabarwienia w czasie jest uzależniony od aktywności enzymu. Papier testowy nasyłony jest substratem i wskaźnikiem - błękitem bromofenolowym w układzie buforowym.

Zmiana zabarwienia jest wynikiem zmiany pH środowiska pod wpływem uwalnianego kwasu. Czas zmiany zabarwienia aż do wyrównania się z barwą papierka kontrolnego uważa się za miernik aktywności ChE. Od momentu kontaktu papierka testowego z surowicą, aż do uzyskania barwy papierka kontrolnego upływa przeciętnie 7 do 18 minut. Doświadczenie wykonuje się z surowicą osobnika zdrowego oraz z surowicą hamowaną prostygminą.

Zmierzony czas wskazuje na aktywność zgodnie z tabelą:

poniżej 5 minut	- aktywność podwyższona
7 - 18	- aktywność normalna
20 - 35	- aktywność obniżona
35 - 150	- aktywność silnie obniżona

13. FOSFATAZY (EC 3.1.3.1 i EC 3.1.3.2)

Fosfatazy hydrolizują estry KWASU FOSFOROWEGO. Swoistość tych enzymów jest mała. W zależności od optimum pH dzieli się na ZASADOWE (pH 8,5 - 9,5) i KWASNE (pH 5,0 - 6,0). Określanie aktywności opiera się na oznaczaniu ilości produktów w ściśle określonych warunkach.



OZNACZANIE AKTYWNOŚCI FOSFATAZY ZASADOWEJ (EC 3.1.3.1)

24

MET. BESSEY-LOWRY'EGO

Fosfataza zasadowa surowicy nie jest jednolitym enzymem, składa się ona z kilku izoenzymów wykrywalnych elektroforetycznie. Również pochodzenie fosfatazy zasadowej surowicy jest różne; może być pochodzenia kostnego, wątrobowego lub jelitowego.

ZWIEKSZENIE AKTYWNOŚCI fosfatazy zasadowej w surowicy powodują CHOROBY KOSCI przebiegające ze wzmożeniem aktywności osteoblastycznej, CHOROBY WĄTROBY, żółtaczką mechaniczną, marskość wątroby oraz krzywicę. W ciąży, między 6 a 9 miesiącem również występuje wzrost aktywności tego enzymu w surowicy krwi.

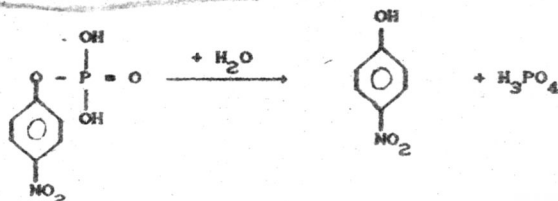
U mężczyzn aktywność fosfatazy zasadowej jest o 20 - 30% wyższa niż u kobiet. U dzieci aktywność fosfatazy zasadowej w łecie jest około

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI

50% niższa niż w zimie, związane to może być z niedoborem witaminy D w okresie zimowym.

OBNIŻENIE AKTYWNOŚCI fosfatazy zasadowej w surowicy obserwuje się w niektórych **CHOROBAH KRWI** (np. białaczki).

ZASADA OZNACZANIA Fosfataza zasadowa surowicy w obecności chlorku manganowego, jako aktywatora rozkłada p-nitrofenylofosforan na fosforan i p-nitrofenol. Reakcję przerywa się wodorotlenkiem sodowym. Bezbarwny p-nitrofenol, w alkalicznym środowisku daje żółtą barwę. Para-nitrofenol spełnia rolę wskaźnika. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do aktywności enzymu.



ODCZYNNIKI :

1. BUFOR GLICYNOWY (pH = 10,4)
2. ROZTWÓR MACIERZYSTY SUBSTRATU (0,4 g p-nitrofenylofosforanu disodowego 100 cm³ 0,001 N HCl).
3. ZASADOWY ROZTWÓR SUBSTRATU (zmieszać równe objętości buforu i substratu).
4. 0,02 N NaOH

KRZYWA WZORCOWA :

Do kolby miarowej na 100 cm³ odważyć 139,1 mg p-nitrofenolu, rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić wodą do kreski. Roztwór ten zawiera 10 μmoli/dm³. Przygotować 6 kolbek miarowych po 100 cm³. Odmierzyć kolejno po 0,5, 1, 2, 3, 4 i 5 cm³ roztworu p-nitrofenolu i uzupełnić wodą do kreski. Do 1 cm³ każdego roztworu wzorcowego wlać 0,1 cm³ wody i 10 cm³ 0,02 N roztworu NaOH. Zmierzyć pochłanianie przy 410 nm wobec wody. Rozcieńczenia odpowiadają 1,2,4,6,8 i 10 jednostkom (Bessy-Lowry'ego). Wykreślić krzywą wzorcową odkładając na osi Y absorbancję, natomiast na osi X - jednostki.

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI

WYKONANIE ĆWICZENIA:

1. Wlać do probówek P-próba i O-próba ślepa po 1 cm^3 alkaliznego roztworu substratu.
2. Ogrzać zawartość w łaźni wodnej o temp. 38°C .
3. Do probówek P-próba wlać $0,1 \text{ cm}^3$ surowicy, a do O-próba ślepa $0,1 \text{ cm}^3$ wody. Odczekać czas.
4. Inkubować dokładnie 30 minut w temp. 37°C .
5. Po 30 minutach wlać do każdej probówki po 10 cm^3 $0,02 \text{ N NaOH}$ i dokładnie zamieszać.
6. Zmierzyć pochłanianie przy 410 nm wobec próby ślepej.
7. Odczytać z krzywej wsorcowej ilość jednostek.

WARTOŚĆ PRAWIDŁOWA :

dorośli -	0,8-2,3	jednostek Bessey-Lowry'ego
dzieci -	2,8-6,7	jednostek Bessey-Lowry'ego

UWAGA :

Badania można wykonać używając $0,05$ lub $0,02 \text{ cm}^3$ surowicy. Należy wtedy proporcjonalnie zmniejszyć ilość wszystkich odczynników.

2 OZNACZANIE AKTYWNOŚCI OKSYDAZ

2.1. CERULOPLAZMINA

Ceruloplazmina jest MIEDZIOPROTEINĄ o własnościach enzymatycznych oksydazy, charakteryzująca się zdolnościami utleniania WIELOFENOLI i DIAMIN. Ceruloplazmina zawiera $0,34\%$ miedzi (8 atomów miedzi w jednej cząsteczce). Zbudowana jest z 8 podjednostek o c. cząstecz. 18000. Prawidłowe stężenie w surowicy krwi wynosi $0,2-0,4 \text{ g/dm}^3$ ($2,0 \pm 0,3 \mu\text{mol/dm}^3$). Ceruloplazmina katalizuje przenoszenie 4 elektronów na cząsteczkę O_2 przy czym powstaje bezpośrednio cząsteczka H_2O .

Optymalne pH dla aktywności tego enzymu wynosi około 5,5. Najlepszym substratem w jego działaniu jest p-fenyldiamina (PPD) oraz jej metylowe pochodne, np. n,n-dimetylo-p-fenylenodiamina (DPD). SUBSTRATEM mogą być również HYDROCHINON, ADRENALINA, KWAS ASKORBINOWY ORAZ JONY Fe^{+2} .

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI

Podatność substratu na działanie ceruloplazminy uwarunkowana jest obecnością grup $-OH$ i $-NH_2$ w pozycji "ORTO" i "PARA".

W początkowym etapie utleniania p-fenylenodiaminy przez ceruloplazminę powstaje kompleks enzym-substrat, dzięki połączeniu Cu^{+2} enzymu z elektronami pierścienia aromatycznego substratu. Elektron zostaje przeniesiony na enzym, przy czym jon miedziowy zostaje zredukowany do miedziowego, a z substratu powstaje rodnik. Zredukowana miedź w ceruloplazminie jest utleniana przez tlen, a powstały z substratu rodnik ulega dalszym przemianom, z nadmiarem nieutlenionej p-fenylenodiaminy tworzy barwny fioletowy produkt.

INHIBITORAMI CERULOPLAZMINY SĄ :

1. ANiony JEDNO- I WIELOWARTOŚCIOWE : azydki, cyjanki, cytrynian, wersenian i jony chlorowców
2. JONY METALI : Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} w stężeniu 10^{-2}
3. PROMIENIOWANIE NADFIOLETOWE
4. HYDRAZYNA, PRONIAZJD, KWASY DIKARBOKSYLOWE.

Jednym z najsilniejszych inhibitorów ceruloplazminy in vivo jest CYTRYNIA. Poza tym w osoczu występują niedializujące się inhibitory o charakterze białkowym: TRANSFERYNA, APOTRANSFERYNA. Ceruloplazmina jest główną oksydazą osocza krwi, jej fizjologicznymi substratami w organizmie są: ADRENALINA, NORADRENALINA, DIHYDROKSYFENYLOALANINA, KW. ASKORBINOWY. Przypisuje się jej właściwości ferrokсыdazy, katalizującej utlenianie żelaza w organizmie. Kontroluje onaprzemianę miedziową regulując wchłanianie miedzi z przewodu pokarmowego. ZWIĘKSZENIE ILOŚCIOWE ceruloplazminy we krwi występuje w ciąży, w zawale mięśnia sercowego, marskości wątroby, zółtacze zakaźnej, ziarnicy złośliwej, anemii złośliwej. OBNIŻENIE STĘŻENIA ceruloplazminy w osoczu krwi obserwuje się w chorobie Wilsona i nerzycy, w której dochodzi do wydalania tego białka przez nerki.

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI



25

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI CERULOPLAZMINY W SUROWICY MET. RAVINA

(Ravin H.A., Harvard M.D., Lancet 1. 726, 1956)

ZASADA Ceruloplazmina katalizuje utlenianie p-fenilenodiaminy (PPD) do białego fioletowego produktu.

Miara aktywności enzymatycznej jest wartość absorbancji uzyskana w warunkach metody, oznaczana przy długości fali 530 nm.

ODCZYNNIKI:

1. 0,5% ROZTWÓR CHLOROWODORKU p-fenilenodiaminy.

Sporządzić nasycony roztwór p-fenilenodiaminy w acetonie. Przy stopniowym dodawaniu stężonego HCl wytrąca się osad chlorowodorku PPD nierozpuszczalny w acetonie, a rozpuszczalny w wodzie. Osad, po przemyciu acetonem suszy się każdorazowo przed seria analiz.

2. 0,1 N BUFOR OCTANOWY o pH 5,5
3. 0,1% ROZTWÓR AZYDKU SODU
4. 3% ROZTWÓR NaCl

WYKONANIE: Do 0,1 cm³ surowicy lub osocza krwi, (nie może być osocze cytrynianowe) wprowadzić 1 cm³ 0,5% roztworu chlorowodorku PPD, 2 cm³ buforu octanowego.

Do próby kontrolnej dodać ponadto 1 cm³ 0,1% roztworu azydki. Po godzinnej inkubacji w temp. 37°C do próby badanej dodać 1 cm³ 0,1% azydki w celu zatrzymania reakcji. Do obu probówek dodać po 6 cm³ 3% roztworu NaCl i po dokładnym wymieszaniu oznaczyć wartość absorbancji wobec próby kontrolnej przy długości fali 530 nm.

Wartości fizjologiczne 0,15 - 0,30 (jednostek gęstości optycznej)

ENZYMY - OZNACZANIE AKTYWNOŚCI

2.2. OKSYDAZA GLUKOZOWA

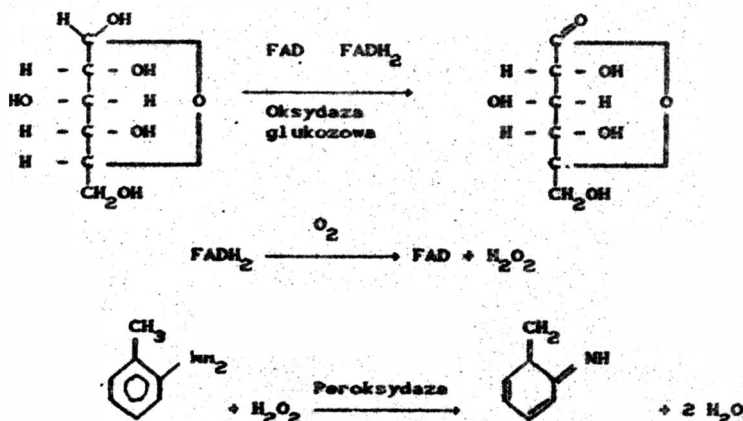


26

OZNACZANIE STEŻENIA GLUKOZY WE KRWI TESTEM BIBULOWYM DEXTROSTIX.

ZASADA: Pasek testowy Dextrostix jest sztywnym celulozowym adsorbentem, którego jeden koniec nasycony jest buforowaną mieszaniną OKSYDAZY GLUKOZOWEJ, PEROKSYDAZY I CHROMOGENU (o-toluidyny), pokryty półprzepuszczalną błoną. Glukoza w obecności oksydazy glukozowej jest utleniana (w atmosferze tlenu) do kwasu glukonowego z równoczesnym wydzielaniem nadtlenu wodoru. Nadtlenek wodoru w obecności peroksydazy utlenia o-toluidynę z leukozwiązku w formę barwną o niebieskim zabarwieniu. Intensywność i odcień niebieskiej barwy na pasku testowym wskazuje na przybliżone stężenie glukozy we krwi.

WYKONANIE: Rozprowadzić kroplę krwi na części testowej paska po stronie z nadrukiem. Odczekać dokładnie 1 minutę. Szybko zmyć krew z paska cienkim strumieniem zimnej wody destylowanej. Porównać natychmiast barwę otrzymaną na pasku ze skalą barw na opakowaniu. Odczytać stężenie glukozy we krwi.



ENZYMY - BADANIE KINETYKI REAKCJI



27

3. BADANIE KINETYKI REAKCJI ENZYMATYCZNYCH

IZOLOWANIE INWERTAZY

ZASADA: Inwertaza należy do hydrolaz rozszczepiających wiązania glikozydowe. Rozkłada dwucukry posiadające wiązania fruktofuranozydowe. W wykonywanym doświadczeniu będzie katalizowała hydrolizę sacharozy według przedstawionego równania:



Bogatym źródłem tego enzymu są drożdże. Miara aktywności enzymu jest ilość uwalnianej glukozy i fruktozy w określonych warunkach. Przedstawiona powyżej reakcja przy pominięciu stężenia wody uczestniczącej w hydrolizie enzymatycznej spełniała warunki reakcji I rzędu.

WYKONANIE: 10g drożdży i 2g celitu utrzeć w moździerzu z 10 cm³ eteru.

UNIKAĆ OGNIU! Nie przerywając ucierania, dodawać stopniowo wodę w pięciu porcjach po 0,5 cm³. Po około 15 minutach ucierania rozłóż drożdże przesączając przez lejek Buchnera. Otrzymany ekstrakt zalać 5 cm³ 1 M buforu octanowego o pH 4,5 i następnie oziębć do temp. 0°C. Dodać 5 cm³ 3% pikrynianu sodowego i odstawić do łaźni lodowej o temp. 0°C na 30 minut. Powstały osad odwirować przy 3000 obr/min przez 10 minut i odrzucić. Nadsącz (supernatant) oziębć w mieszaninie oziębłającej (utarty lód zmieszany z NaCl) do -10°C i dodać trzykrotną objętość acetonu. Osad w większej części przyklejony do ścian naczynia przemyć kilkoma porcjami zimnego acetonu i w końcu zimnym eterem. Przemyty i osuszony osad rozpuścić w 10 cm³ wody i w tej postaci przechowywać w lodówce do dalszych doświadczeń.



28

OKREŚLANIE WPŁYWU STĘŻENIA SUBSTRATU - SACHAROZY NA SZYBKOŚĆ REAKCJI KATALIZOWANEJ PRZEZ INWERTAZĘ.

Jak wspomniano uprzednio pomiar aktywności inwertazy można wykonać oznaczeniem stężenia glukozy i fruktozy metodą redukcyjną. W miarę postępowania hydrolizy sacharozy wzrasta stężenie cukrów redukujących. Redukujące własności cukrów prostych jako produktów hydrolizy enzyma-

ENZYMY - BADANIE KINETYKI REAKCJI

tycznej można oznaczyć wykorzystując sprzężony układ oksydacyjno-redukcyjny (odczynnik miedziowy: odczynnik arsenomolibdenowy). Końcowym produktem barwnym układu są pięcio- i trójtlenki molibdenu, służące do ilościowego oznaczania kolorymetrycznego powstałego inwertu.

ODCZYNNIKI :

1. ODCZYNNIK MIEDZIOWY A - roztwór weglanu sodowego i winianu sodowo-potasowego
2. ODCZYNNIK MIEDZIOWY B - roztwór siarczanu miedziowego
3. ODCZYNNIK MIEDZIOWY NELSONA (roboczy) - 25 cm^3 odczynnika A + 1 cm^3 odczynnika B
4. ODCZYNNIK ARSENO-MOLIBDENOWY - roztwór molibdenianu amonowego + arsenianu sodowego (patrz oznaczanie hydrolizy glikogenu).
5. 0,1 M BUFOR OCTANOWY o pH 4,7
6. 0,1 M, 0,05 M i 0,025 M ROZTWORY SACHAROZY w 0,1 M buforze octanowym o pH 4,7
7. 0,1 N NaOH
8. ROZTWÓR STANDARDOWY GLUKOZY o stężeniu $50 \text{ mg}/100 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$ (do krzywej wzorcowej).

PRZYGOTOWANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ

WYKONANIE: Do 5 probówek dodać kolejno wzrastające ilości roztworu glukozy (standardowego roztworu glukozy), od 0 do $1,6 \text{ cm}^3$, do każdej probówki dodać również $0,2 \text{ cm}^3$ 0,1 M buforu octanowego o pH 4,7 i po $0,1 \text{ cm}^3$ 0,1N roztworu NaOH. Wszystkie probówki dopełnić wodą do objętości 2 cm^3 (jak przedstawiono w tabeli). Następnie dodać po 2 cm^3 odczynnika miedziowego Nelsona i gotować we wrzącej łaźni wodnej przez 20 minut. Po ostudzeniu probówek dodać ostrożnie i powoli po 2 cm^3 odczynnika arseno-molibdenowego. Z uzyskanego w każdej probówce roztworu barwnego pobrać po 1 cm^3 i przenieść do odpowiednio ponumerowanych probówek wypełnionych 10 cm^3 wody. Po zmieszaniu dokonać odczytu absorbancji fali 520 nm (Spekol). Na papierze milimetrowym wykreślić zależność absorbancji od stężenia glukozy.

ENZYM - BADANIE KINETYKI REAKCJI

ODCZYNNIKI (w cm^3)	KOLEJNE PROBÓWKI				
	0	1	2	3	4
STANDARDOWY ROZTWÓR GLUKOZY	-	0,4	0,8	1,2	1,6
BUFOR OCTANOWY pH 4,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,1 N NaOH	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H ₂ O dest.	1,7	1,3	0,9	0,5	0,1
ODCZYNNIK NIEDZIOWY NELSONA	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Ogrzewać przez 20 minut we wrzącej łaźni wodnej					
ODCZYNNIK ARSENO-MOLIBDENOWY	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0



29

WYZNACZANIE KRZYWEJ MICHAELISA

WYKONANIE: Do badania wpływu stężenia substratu na szybkość reakcji enzymatycznej wybieramy wstępnie właściwe stężenie enzymu - uprzednio wyizolowanej inwertazy. Enzym przechowywany w lodówce rozcieńczamy przed przystąpieniem do doświadczenia 10 - 20 krotnie.

Przygotować po 4 próbówki dla każdej serii oznaczeń - wykorzystując trzy różne stężenia sacharozy: 0,1 M, 0,05 M i 0,025 M w 0,1 M buforze octanowym o pH 4,7.

Przygotować 4 próbówki, do każdej dodać po 2 cm^3 odczynnika miedziowego Nelsona, 1,5 cm^3 wody i 0,1 N NaOH. Inkubację enzymu z różnymi stężeniami sacharozy wg tabeli przeprowadzić w temp. 25 °C.

ENZYMY - BADANIE KINETYKI REAKCJI

Skład mieszaniny inkubacyjnej (enzym-substrat)	I	II	III
	3cm ³ enzymu + 3cm ³ 0,1 M roz. sacharozy	3cm ³ enzymu + 3cm ³ 0,05 M roz. sacharozy	3cm ³ enzymu + 3cm ³ 0,025 M roz. sacharozy
Czas inkubacji (w minutach)	0-5-10-15	0-5-10-15	0-5-10-15
Ilość powstającej glukozy i fruktozy w mg			

W czasie 0, a następnie po 5, 10 i 15 minut pobrać po 0,4 cm³ mieszaniny inkubacyjnej (enzym - substrat) do uprzednio przygotowanych probówek z odczynnikiem miedziowym (przez dodanie mieszaniny enzym - substrat do odczynnika miedziowego powoduje się zahamowanie reakcji enzymatycznej). Probkę w czasie 0 - (kontrola) sporządzić można przez oddzielne dodanie 0,2 cm³ enzymu i 0,2 cm³ substratu tj. sacharozy do odczynnika miedziowego. Uzyskane w powyższy sposób roztwory w 4 probówkach do oznaczeń stężenia glukozy i fruktozy, a pochodzące z różnych czasów hydrolizy sacharozy: 0, 5, 10, 15 min. oraz jedną probówkę zawierającą same odczynniki bez enzymu - tzw. ślepa próbę odczynnikową ogrzewa się przez 20 minut na wrzącej łaźni wodnej. Wszystkie dalsze czynności przeprowadza się analogicznie jak w przygotowaniu krzywej wzorcowej.

Z krzywej wzorcowej odczytać ilość mg glukozy i fruktozy powstających w poszczególnych czasach hydrolizy.

DLA KAŻDEGO CZASU WYKONAĆ NASTĘPUJĄCE CZYNNOŚCI:

1. Oznaczyć z krzywej wzorcowej przyrost ilości produktów hydrolizy sacharozy: glukozy i fruktozy w czasie inkubacji enzymatycznej; wyniki zestawić w tabelce.
2. Sporządzić wykresy zależności szybkości reakcji, wyrażonych ilościami

ENZYMY - BADANIE KINETYKI REAKCJI

mg powstających heksoz. od czasu inkubacji.

3. Wyznaczyć szybkości początkowe, jako tangensy kątów α jakie dają styczne do początkowych części krzywych po 5 minutach inkubacji i podać je w mg glukozy /minuta; (patrz przykładowe wykresy).
4. Sporządzić wykres zależności szybkości początkowych od stężenia substratu.
5. Stosując przekształcony wzór Lineweavera i Burka wyznaczyć graficznie i podać wartość uzyskanej eksperymentalnie K_m .

W przypadku prawidłowo przeprowadzonego doświadczenia okazuje się, że przy tych samych stężeniach enzymu uzyskuje się coraz większą szybkość reakcji w miarę wzrostu stężenia użytego substratu. Z otrzymanych w doświadczeniu, początkowych szybkości reakcji dla każdego stężenia substratu wykreślamy krzywą ilustrującą zależność wzrostu szybkości reakcji od wzrostu stężenia substratu. Otrzymana krzywa ma kształt hiperboli, a zatem dla danego stężenia enzymu istnieje takie stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji osiąga wartość praktycznie równą szybkości maksymalnej i dalsze zwiększenie stężenia substratu nie powoduje już zmiany tempa reakcji. Stężenie substratu, przy którym szybkość osiąga połowę szybkości maksymalnej nazywamy stałą Michaelisa - K_m . Wartość ta, określa powinowactwo enzymu do substratu. Wyznaczenie stałej Michaelisa z krzywej mającej postać hiperboli jest obciążone poważnym błędem, dlatego też w praktyce stosuje się graficzne wyznaczenie K_m z wzoru Lineweavera i Burka podanego na stronie.

Na osi x (odciętych) odkładamy wartość $\frac{1}{[S]}$ tj. odwrotności użytych w doświadczeniu stężeń substratu, zaś na osi y (rzędnych) odkładamy odwrotności szybkości początkowych $\frac{1}{V}$ reakcji dla danych stężeń substratu. Wykreślić krzywą zależności $\frac{1}{V}$ od $\frac{1}{[S]}$. Otrzymuje się wykres linii prostej, która w miejscu przecięcia z osią x daje wartość $-\frac{1}{K_m}$.

Wartość K_m wyrażamy w molowym stężeniu substratu - mol/dm³

ENZYM - BADANIE KINETYKI REAKCJI

Zestawienie prędkości początkowych w zależności od stężenia substratu

Stężenie sacharozy	$\frac{1}{[S]}$	Prędkości początkowe V (tg ω)	Odwrotność prędkości początkowych $\frac{1}{v}$ (ctg ω)
0,1 M	10		
0,05 M	20		
0,025 M	40		

ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

7.10. KLASYFIKACJA SYSTEMOWA ENZYMÓW

W klasyfikacji systematycznej enzymy oznaczają się według kodu liczbowego czterema liczbami arabskimi oddzielonymi kropkami.

Pierwsza cyfra wskazuje na przynależność enzymu do jednej z sześciu zasadniczych grup:

1. OKSYDOREDUKAZY
2. TRANSFERAZY
3. HYDROLAZY
4. LIAZY
5. IZOMERAZY
6. LIGAZY CZYLI SYNTEZASY

Kolejna druga liczba określa podklasę w ramach danej grupy enzymatycznej. Liczba trzecia oznacza przynależność danego enzymu do podpodklasy. Ostatnia czwarta liczba określa konkretnie dany enzym w ramach podpodklasy.

KLASA	PODKLASA	PRZYKŁAD KATALIZOWANEJ REAKCJI
1. OKSYDOREDUKAZY Oksydoreduktazy są enzymami katalizującymi reakcje oksydoredukcji między 2 substratami $S-S_1$. S zredukowany + S_1 utleniony $\longrightarrow$ S utleniony + S_1 zredukowany.	1.1. Działające na grupę -CH-OH	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{Dehydrogenaza alkoholowa}} \text{CH}_3\text{COH} + \text{NADH} + \text{H}^+$
	1.2. Działające na grupę -C=O	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H-C-OH} \end{array} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{Dehydrogenaza mrówczanowa}} \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$

ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

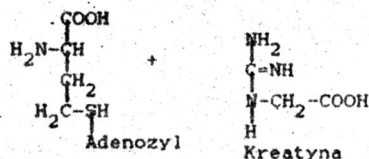
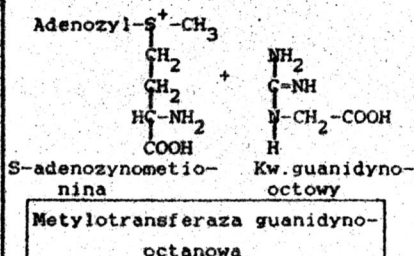
1.3.Działające na grupę -HC=CH-	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-\text{SCoA}$ acylo-CoA Dehydrogenaza acylo-CoA $\text{FAD} \rightleftharpoons \text{FADH}_2$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{ }}{\text{C}}}-\text{SCoA}$ 2.3-dehydroacylo CoA
1.4.Działające na grupę -CH-NH_2	Dehydrogenaza glutaminianowa $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} \xrightarrow{\text{NAD(P)}} \text{NAD(P)}\text{H}^- + \text{H}^+$ kw. glutaminowy $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} + \text{NH}_3$ kw. 2-imino-glutaminowy kw. 2-oksylutarowy
1.5.Działające na grupę -CH-NH	Kw. 7.8 Dihydrofoliowy $\longrightarrow$ $\text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NADP}^+$ Kw. 5.6.7.8 Tetrahydrofoliowy
1.6.Działające na zredukowany $\text{NADH} + \text{H}^+$ lub $\text{NADPH} + \text{H}^+$ i inne	Transhydrogenaza NAD(P) $\text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{NADH} + \text{H}^+$ $\text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NADP}^+$

ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

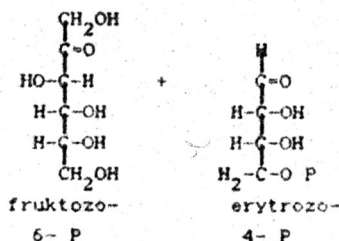
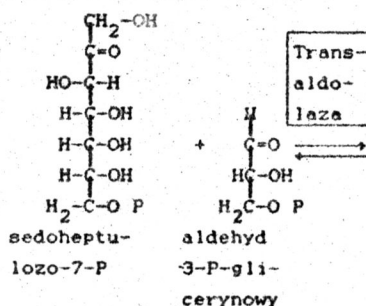
2. TRANSFERAZY

są enzymami
przenoszącymi
funkcjonalne
grupy

2.1. Przenoszące grupy jednowęgłowe



2.2. Przenoszące grupy $\text{C}=\text{O}$
lub $\text{C}=\text{O}$



ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

2.3.Acetylo- transferazy	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{-C} \sim \text{SCoA} + \\ \text{Acetylo-CoA} \end{array} $ Acetylo- transferaza $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ + \text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{-CH}_3 \\ \\ \text{Cholina} \quad \text{CH}_3 \end{array} \xrightarrow{\text{cholinowa}} $ $ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3\text{-C-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{-CH}_3 \\ \\ \text{Acetylocholina} \quad \text{CH}_3 \end{array} + \text{HSCoA} $
2.4.Glikozylo- transferazy	$ (\alpha\text{ 1-4 glukozyl})_n + \text{ortofosforan} $ Fosforylaza glikogenowa $ \xrightarrow{\hspace{1cm}} (\alpha\text{ 1,4 glukozyl})_{n-1} + \alpha\text{-D-Glukozo-1-fosforan} $
2.5.Przeno- szące grupy alkilowe lub pokrewne	Adenozylotransferaza metioninowa $ \text{ATP} + \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H-C-NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S-CH}_3 \end{array} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N-C} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S}^+\text{-Adenozyl} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} + \text{P} + \text{PP} $
2.6.Przenoszą- ce grupy za- wierające azot	Aminotransfe- raza asparagi- nianowa $ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N-C-H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} + \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C=O} \\ \\ (\text{CH})_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} $ kw.aspara- ginowy kw.2-keto- glutarowy

ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

		$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C=O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} + \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} $ kw. burszty- nowy kw. glutami- nowy
	2.7. Przeno- szące grupy zawierające fosfor i inne	Kinaza glukozy-6-P ATP + Glukoza $\longrightarrow$ Glukozy-6-P + ADP
3 HYDROLAZY enzymy katalizujące rozbitcie związków na drodze hydrolizy	3.1. Działające na wiązania estrowe	Fosfataza $ \text{R-CH}_2\text{-O-P} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \text{R-CH}_2\text{-OH} + \text{H}_3\text{PO}_4 $
	3.2. Działające na związki glikozydowe	4-Glukanohydrolaza α-1,4-glukanu (α-amylaza) Hydrolizuje wiązania α-1,4 glikozydowe. Działa na skrobię, glikogen.
	3.3. Działające na wiązania eterowe	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ + \text{S-H} \end{array} \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{SH} \end{array} + \text{Adenozy-} \\ \text{Adenozy} \hspace{10em} \text{Homocysteina} \\ \text{S-Adenozylohomocysteina} $

ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

	3.4.Działające na wiązania peptydowe	Karboksy-peptydaza $+ H_2O$ $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Peptydylo-L-aminokwas peptyd + L-aminokwas
	3.5.Działające na wiązania C-N różne od wiązań peptydowych	Asparagi-naza H_2O $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ $\begin{array}{c} COOH \\ \\ H-C-NH_2 \\ \\ CH_2 \\ \\ C-NH_2 \\ \\ O \end{array}$ L-asparagina $\begin{array}{c} COOH \\ \\ H-C-NH_2 \\ \\ CH_2 \\ \\ C-OH \\ \\ O \end{array}$ kw.asparagi-nowy $+ NH_3$
	3.6.Działające na wiązania bezwodników kwasowych i inne	Pirofosfataza nukleotydomowa $+ H_2O$ $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Difosfonukleotyd Monofosfonukleotyd + P_i
4. LIAZY. enzymy rozbijające niehydrolitycznie wiązania C-O, C-N, C-S, C-Cl i usuwające z substratu lub dołączające do niego pewne grupy.	4.1.Liazy wiązania C-C	Dekarboksylaza pirogronianowa $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ $\begin{array}{c} COOH \\ \\ C=O \\ \\ CH_3 \end{array}$ kw.pirogronowy (2-oksypropionowy) $\begin{array}{c} H \\ \\ C=O \\ \\ CH_3 \end{array}$ aldehyd octowy $+ CO_2$
	4.2.Liazy wiązania C=O	Hydrataza fumaranowa $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ $\begin{array}{c} COOH \\ \\ H-C-OH \\ \\ CH_2 \\ \\ COOH \end{array}$ kw.L-jabikowy $\begin{array}{c} COOH \\ \\ CH \\ \\ HC \\ \\ COOH \end{array}$ kw.fumarowy $+ H_2O$

ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

	4.3. Liazы wiązania C-N	$\begin{array}{c} \text{NH} \quad \text{COOH} \\ \quad / \\ \text{HN}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{COOH} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ kw. arginino- bursztynowy Liaza argi- ninobursz- tynianowa $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HN}-\text{C} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ arginina $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ + $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ kw. fumarowy
	4.4. Liazы wiązania C-S i inne	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{SH} \end{array} \xrightarrow{-\text{H}_2\text{S}} \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array} \longrightarrow$ cysteina kw. amino- akrylowy $\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}-\text{NH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \xrightarrow{+\text{H}_2\text{O}} \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} + \text{NH}_3$ kw. imino kw. pirogro- propionowy nowy
5. IZOMERAZY enzymy, katalizu- jące wzajemne przekształcenia izomerów optycz- nych, geometrycz- nych lub izomerów położenia.	5.1. Racemazy i epimerazy 5.2. Izomerazy cis-trans	Racemaza alaninowa L-alanina $\longrightarrow$ D-alanina Izomeraza maleinianowa $\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{HCOO}-\text{C}-\text{H} \end{array}$ kw. maleinowy kw. fumarowy

ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

5.3. Oksydo-reduktazy wewnątrzcząsteczkowe (katalizujące wzajemne przekształcanie aldoz i ketoz)	Izomeraza triozofosforanowa $ \begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad // \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P} \end{array} & \rightleftharpoons & \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P} \end{array} \\ \text{aldehyd} & & \text{fosfodihydroksy} \\ \text{3-fosfo-D-glicerynowy} & & \text{aceton} \end{array} $
5.4. Transferazy wewnątrzcząsteczkowe	Fosfomutaza fosfoglicerynianowa $ \begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P} \end{array} & \rightleftharpoons & \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{P} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array} \\ \text{kw. 3-fosfoglicerynianowy} & & \text{kw. 2-fosfoglicerynianowy} \end{array} $
[6. LIGAZY] (SYNTETAZY) Enzymy katalizujące syntezę związaną z rozbićciem wiązania pirofosforanowego w ATP lub innych nukleotydach wysokoenergetycznych	C-O $ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \quad \text{O} \\ \quad // \\ \text{R}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{adenozyna} + \text{tRNA} \\ \\ \text{H} \end{array} $ Syntetazy aminoacylo-tRNA $ \xrightarrow{\hspace{2cm}} $ $ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{R}-\text{CH}-\text{C}-\text{t-RNA} + \text{AMP} \\ \\ \text{O} \end{array} $
6.2. Wytwarzające wiązania C-S	Syntetaza acylo-CoA $ \begin{array}{l} \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} + \text{ATP} \longrightarrow \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{P}-\text{adenozyna} + \text{PP}_1 \\ \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{P}-\text{adenozyna} + \text{HS-CoA} \longrightarrow \\ \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{S-CoA} + \text{AMP} \\ \text{acylo CoA} \end{array} $

ENZYMY - KLASYFIKACJA SYSTEMOWA

6.3. Wytwarzające wiązania C-N	Syntetaza glutaminowa $ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} + \text{NH}_3 \xrightarrow[\text{ADP} + \text{P}_i]{\text{ATP}} $ kw. L-glutaminowy $ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $ L-glutamina
6.4. Wytwarzające wiązania C-C (są to białka zawierające biotyne)	Karboksylaza pirogronianowa $ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{ADP} + \text{P}_i]{\text{ATP}} $ kw. pirogronowy $ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} $ kw. szczawiooctowy

KOENZYMY

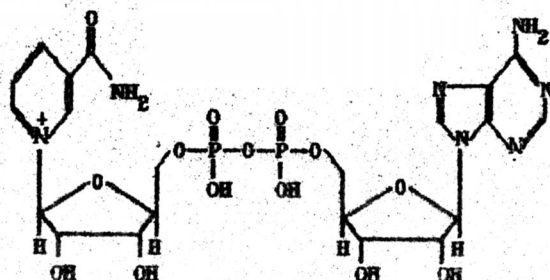
7.11. KOENZYMY I ODPWIEDNIE WITAMINY

KOENZYM	FUNKCJA	WITAMINA
FOSFORAN PIRYDOKSALU	Transaminacja Dekarboxylacja Racemizacja	PIRYDOKSAL (WIT. B ₆)
PIROFOSFORAN TIAMINY (DPT; TPP)	Tlenowa dekarboxylacja Przenoszenie grup karboksylowych	TIAMINA (WIT. B ₁)
CoA	Przenoszenie acyli Tlenowa degradacja i synteza kwasów tłuszczowych	KW. PANTOTENOWY
KW. TETRAHYDRO- FOLIOWY (FH ₄)	Przenoszenie grup jednowęglowych	KW. FOLIOWY
BIOTYNA	Przenoszenie CO ₂	BIOTYNA (WIT. H)
NAD ⁺	Przenoszenie H ⁺ + e ⁻	KW. MIKOTYNOWY (NIACYNA, WIT. PP)
NADP ⁺	Przenoszenie H ⁺ + e ⁻	KW. MIKOTYNOWY (NIACYNA, WIT. PP)
FMN	Przenoszenie H ⁺ + e ⁻	RYBOFLAWINA (WIT. B ₂)
FAD	Przenoszenie H ⁺ + e ⁻	RYBOFLAWINA (WIT. B ₂)

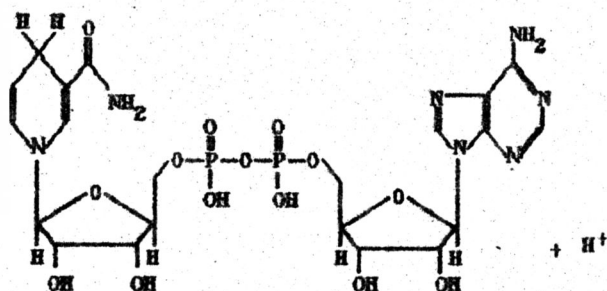
KOENZYMY

8. KOENZYMY

8.1. KOENZYMY OKSYDOREDUKTAZ



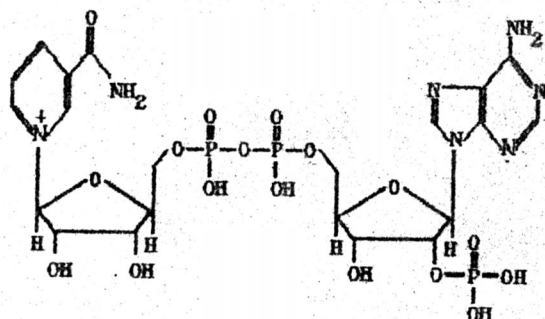
Dinukleotyd nikotynamidoadeninowy NAD^+



Dinukleotyd nikotynamidoadeninowy $\text{NADH} + \text{H}^+$

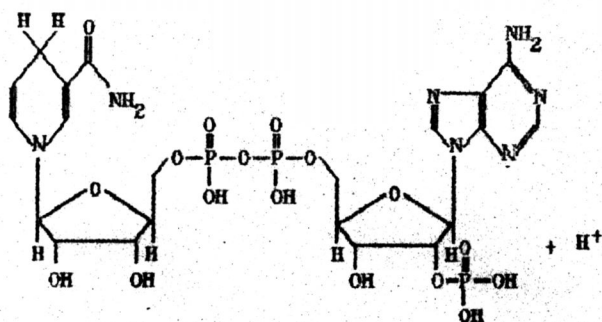
Forma zredukowana

KOENZYMY



Fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

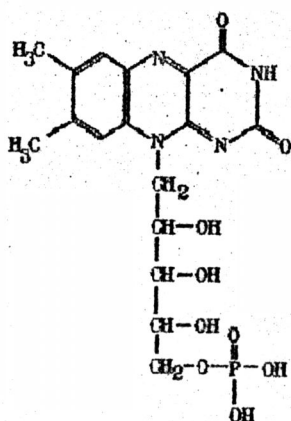
NADP +



Fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego NADPH+H⁺

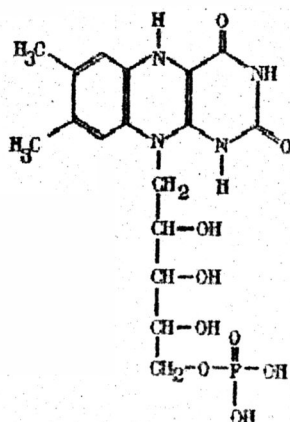
Forma zredukowana

KOENZYM



Mononukleotyd flawinowy

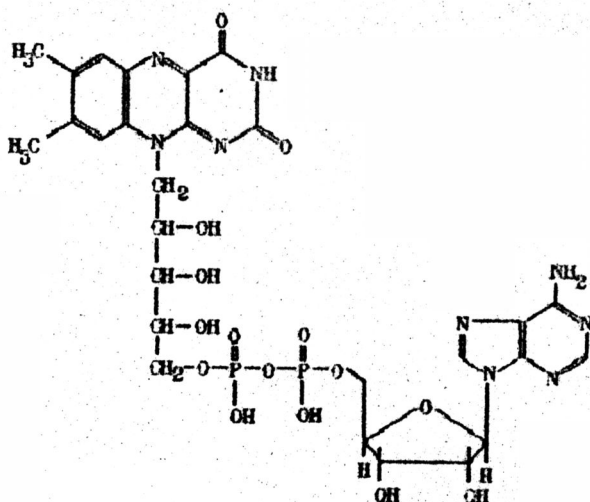
FMN



Mononukleotyd flawinowy

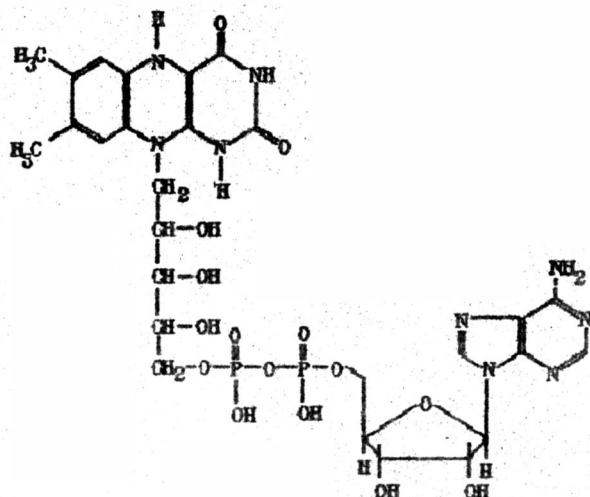
FMNH₂

Forma zredukowana



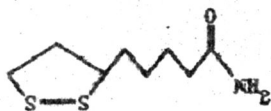
Flawinoadeninowy FAD

KOENZYMY

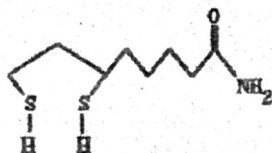


Dinukleotyd flawinoadeninowy FADH_2

Forma zredukowana

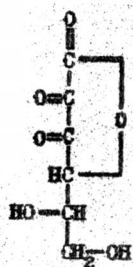


Amid kwasu liponowego

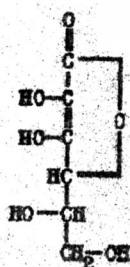


Amid kwasu liponowego -
- forma zredukowana

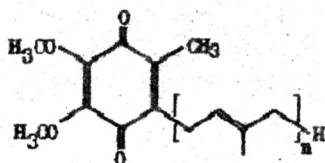
KOENZYMY



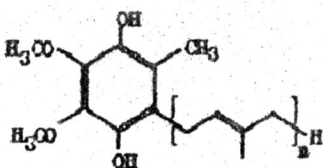
Kwas dehydro -
L-askorbinowy



Kwas askorbinowy
(lakton kwasu 1-keto-L-gulonowego)



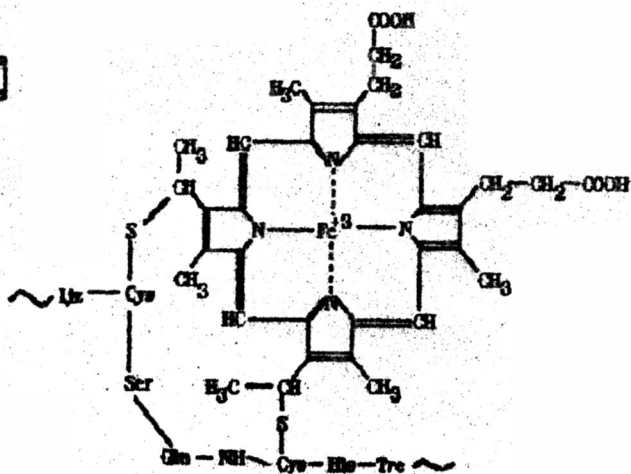
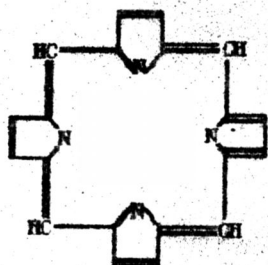
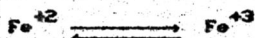
Ubichinon



Ubihydrochinon

KOENZYMY

HEMINY KOMORKOWE - w których pierścienie pirolowe powiązane są grupami - CH -. Związki te zawierają atom Fe^{+2} związany z atomami azotu pierścieni pirolowych oraz białko. Związki te przenoszą elektrony.



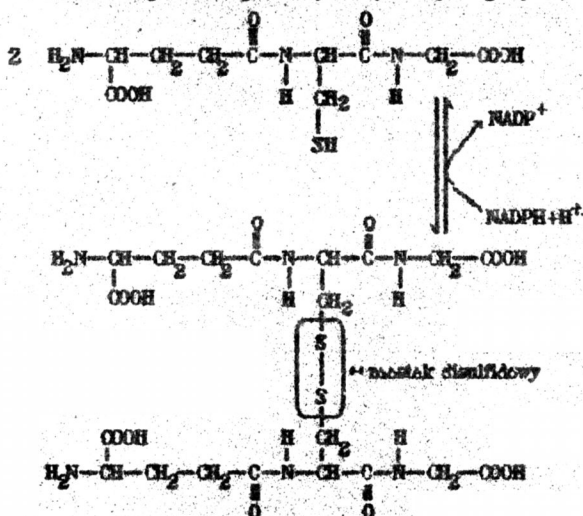
Cytochrom C

KOENZYMY

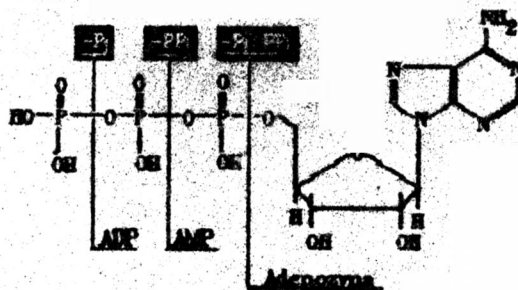
GLUTATHIONE

Po usunięciu dwóch protonów powstaje utleniona postać glutationu.

Glutathione GSH (gamma-glutamyl-L-cysteinylglycine)



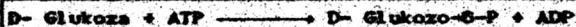
B. 2. KOENZYM TRANSFERAZ



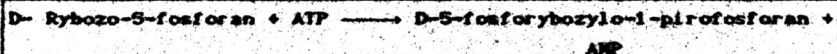
Adenogynotriphosphate ATP

KOENZYMY

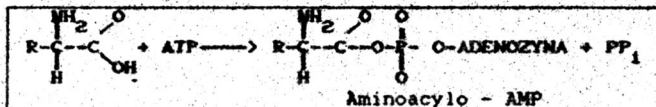
- I** Adenozyno trójfosforan może przenosić jedną resztę fosforanową w reakcji **HEKSOKINAZOWEJ**.



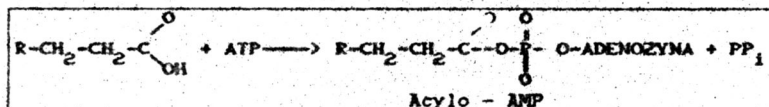
- II** ATP może przenosić resztę pirofosforanową np. w reakcji katalizowanej przez **KINAZĘ FOSFORYBOZOPIROFOSFORANOWĄ**.



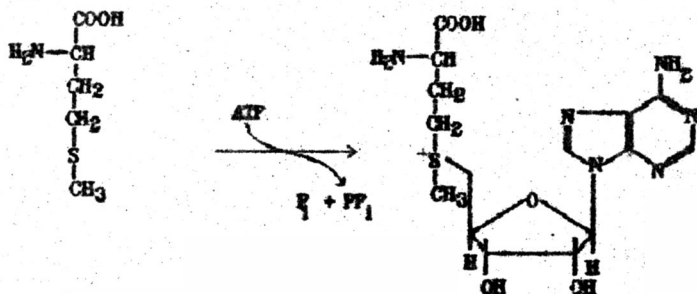
- III** ATP może przenieść resztę AMP w reakcji katalizowanej przez **SYNTETAZĘ AMINOACYLO - tRNA**



oraz w reakcji katalizowanej przez **SYNTETAZĘ ACYLO-CoA**

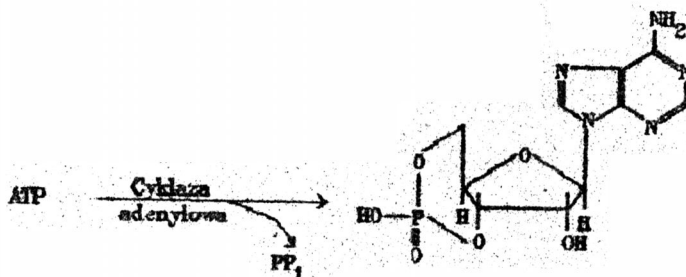


- IV** ATP może przenieść resztę **ADENOZYNOWĄ** np. w reakcji katalizowanej przez **ADENOZYNO-TRANSFERAZĘ METIONINOWĄ**.



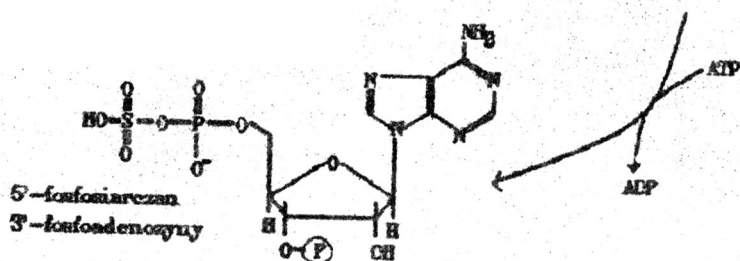
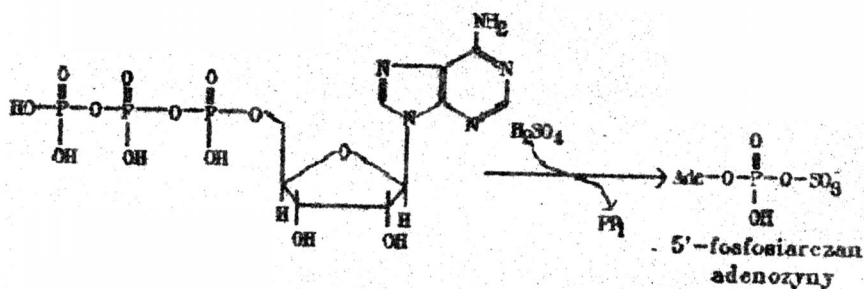
KOENZYM

- ✓ Tworzenie cyklicznego AMP (cAMP) z ATP w wyniku działania CYKLAZY ADENYLANOWEJ.



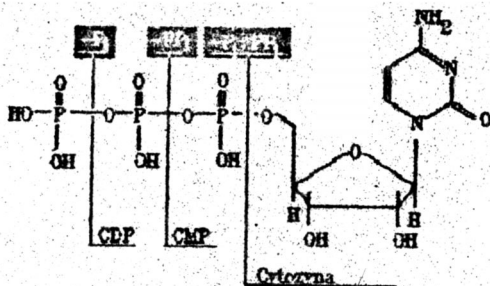
Cykliczny adenozyntrojfosforan (cAMP)

Aktywny siarczan - PAPS



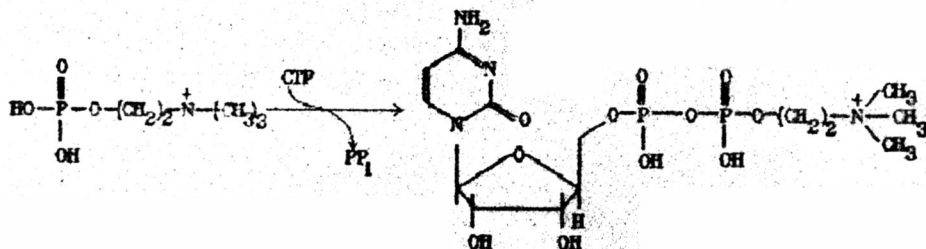
KOENZYMY

2.



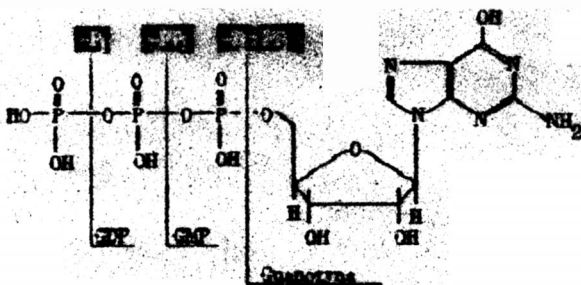
Cytdynotrofosforan (CTP)

Związek ten uczestniczy w reakcji przenoszenia **AKTYWNEJ CHOLINY**.



CDP-cholina

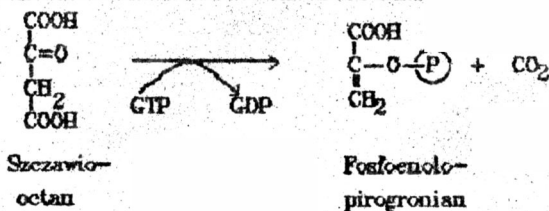
3.



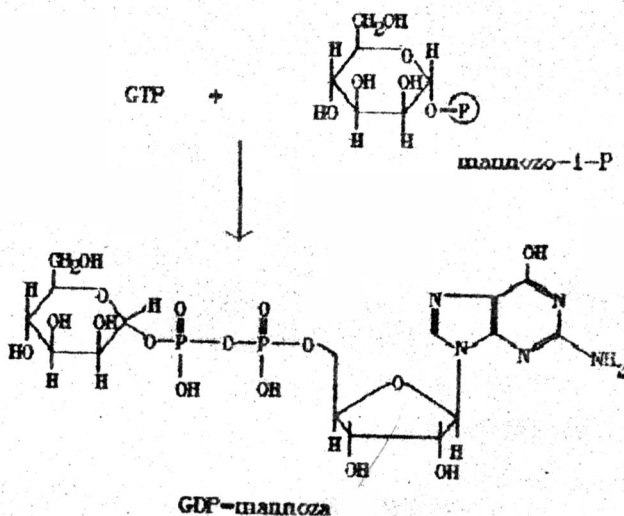
Guanosynotrofosforan (GTP)

KOENZYMY

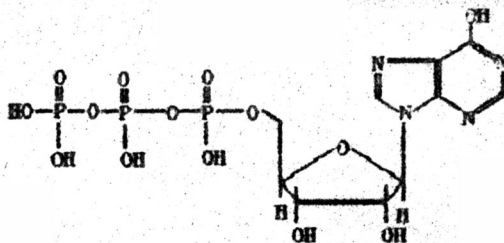
1 Koenzym KARBOKSYLAZY FOSFOENOLOPIROGRONTANU



2 GTP uczestniczy w reakcjach przenoszenia AKTYWNEJ MANNOZY



4.

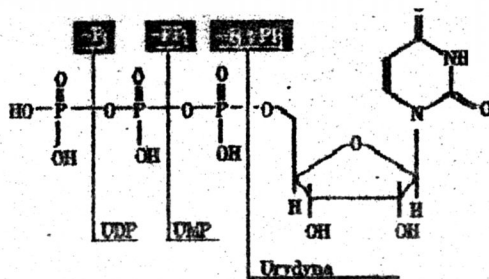


Inozynotrojfosforan ATP

KOENZYMY

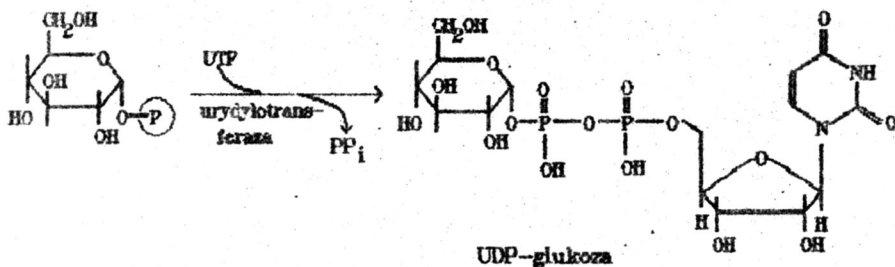
Koenzym ten pełni wymiennie z GTP funkcję reszty fosforanowej w reakcji katalizowanej przez **KARBOKSYKINAZĘ FOSFOENOLOPIKROTONIANU** (patrz GTP).

5.

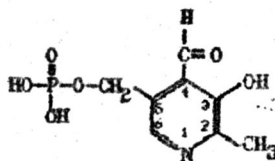


Urydynotrofosforan UTP

Związek ten służy jako koenzym w reakcji tworzenia **UDPG-GLUKOZY**.



6.

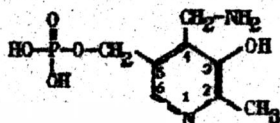


Fosforan pirydoksalu - PLP (PAL)

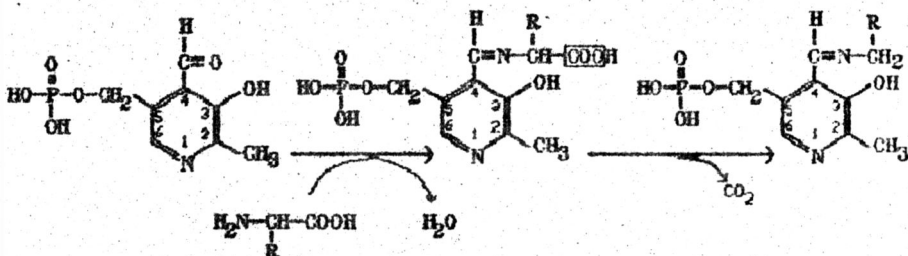
KOENZYM

Funkcją tego koenzymu jest:

- 1/ **PRZENOSZENIE GRUPY AMINOWEJ** z aminokwasu na ketokwas - forma pośrednia jest FOSFORAN PIRYDOKSAMINY.



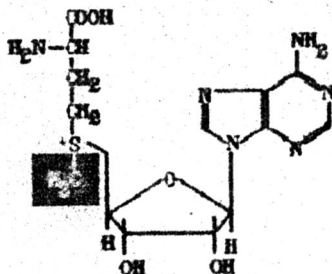
- 2/ **DEKARBOKSYLACJA AMINOKWASÓW** do amin - forma pośrednia jest ZASADA SCHIFFA.



- 3/ **DESULFURACJA**
- 4/ **OKSYDACYJNA DEZAMINACJA** (niektórych aminokwasów)
- 5/ **USUNIĘCIE Z AMINOKWASÓW RODNIKA CR** W WYNIKU POWSTAJE GLICINA

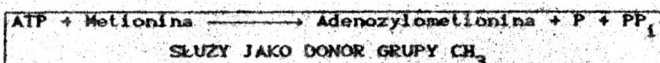
8.2.1 KOENZYM PRZENOSZĄCE FRAGMENTY C₁

S-adenozylometyonina SAM

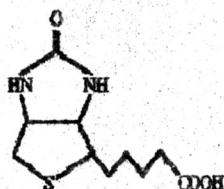


KOENZYMY

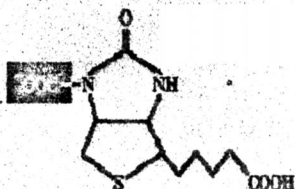
Związek ten powstaje w reakcji katalizowanej przez ADENOZYLOTANSFERAZĘ METIONINOWĄ z



2.



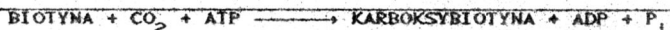
Biotyna



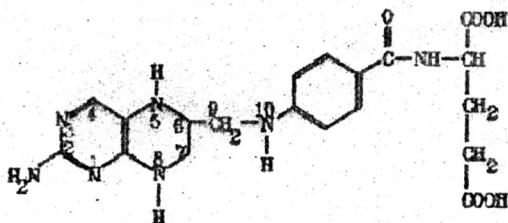
Karboksybiotyna

KARBOKSYBIOTYNA jest koenzymem KARBOKSYLAZ KARBOKSYLAZY PIROGRONIANOWEJ, KARBOKSYLAZY ACETYLO CoA, KARBOKSYLAZY PROPIONYLO CoA.

KARBOKSYBIOTYNA powstaje w wyniku reakcji:

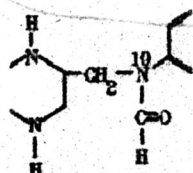


3.



Kwas 5,6,7,8-tetrahydrofolistowy

A



Kwas N¹⁰-formyltetrahydrofolistowy

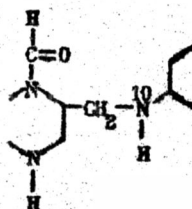
PRZENOSZONA GRUPA



Służy do syntezy nukleotydów purynowych.

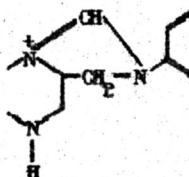
KOENZYMY

B



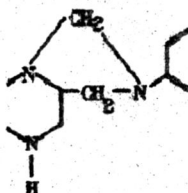
Kwas N⁵-formylotetrahydrofolowy

C



Kwas N⁵N¹⁰-metenylotetrahydrofolowy

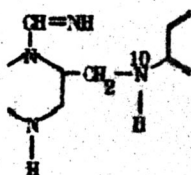
D



Kwas N⁵N¹⁰-metylenotetrahydrofolowy

(Służy do biosyntezy nukleotydów purynowych)

E



Kwas N⁶-formiminotetrahydrofolowy

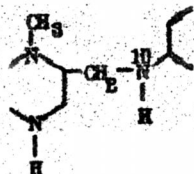
-CH = NH

FORMIMINOWA

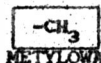
(Służy do przenoszenia grup iminowych z aminokwasów Gly, Glu. Po przekształceniu w metenylotetrahydrofolian dostarcza C₂ pierścienia purynowego).

KOENZYMY

F

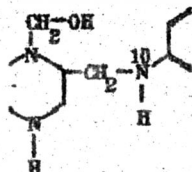


Kwas N⁵-metylotetrahydrofolowy

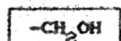


(Służy do metylacji homocysteiny przekształcając ją w metioninę).

G



Kwas N⁵-hydroksymetylotetrahydrofolowy



HYDROKSYMETYLOWA

(Służy do metylacji dUMP w dTMP).

DAWCAMI GRUP C₁ PRZENOSZONYCH PRZEZ FH₄ SĄ AMINOKWASY:

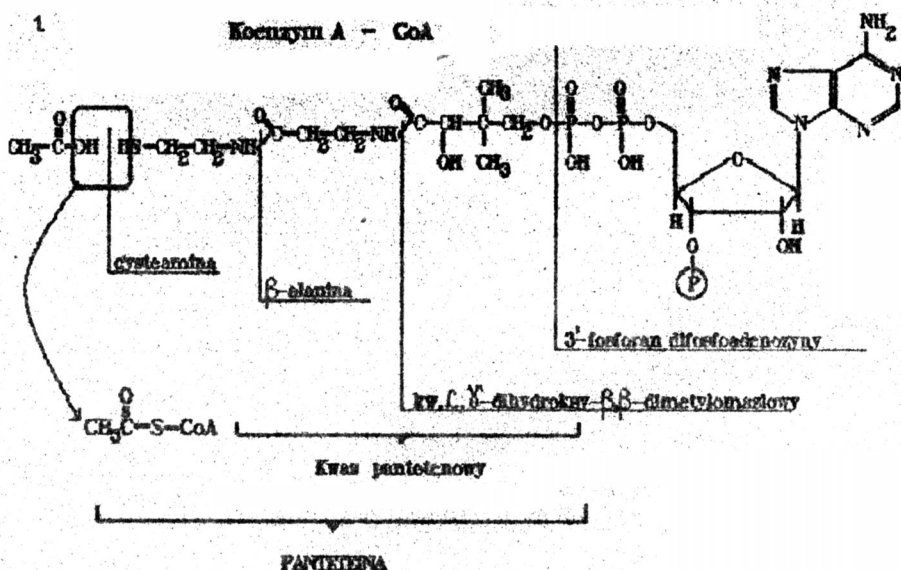
Grupa metylowa	- CH ₃	_____	METIONINA
Grupa formiminowa	- CH = NH	_____	HISTYDYNA
Grupa hydroksy metylowa	- CH ₂ OH	_____	SERYNA
Grupa metylenowa	- CH ₂ -	_____	SERYNA i GLICYNA
Grupa metenylowa (metylidenowa)	= CH -	_____	SERYNA
Grupa formylowa	- C(=O) - H	_____	TRYPTOFAN

KOENZYMY

8.2.2. KOENZYMY PRZENOSZĄCE FRAGMENTY C_2 I WIĘCEJ

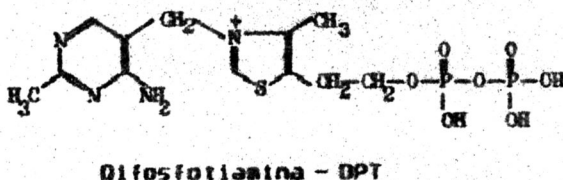
1

Koenzym A - CoA



Najważniejszą formą CoA jest jego połączenie z grupą [ACETYLOWĄ] w $CH_3-C(=O)-SCoA$. Związek ten powstaje głównie w wyniku przemian kw. tłuszczowych i węglowodanów.

2

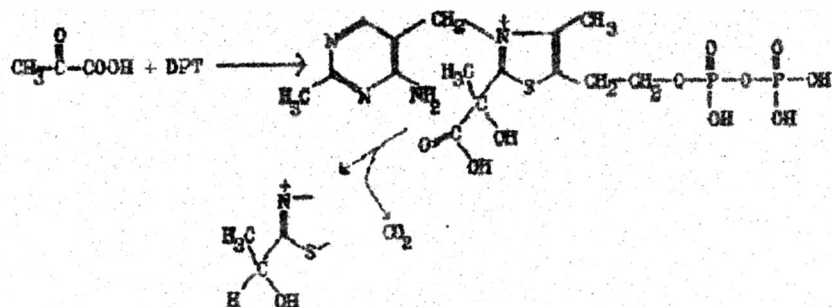


Dawniej określana jako PIROFOSFORAN TIAMINY (TPP)

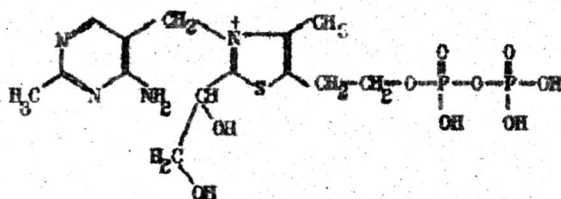
KOENZYM TEN PRZENOSI:

1. GRUPE ALDEHYDU OCTOWEGO, powstała w wyniku dekarboksylacji kw. pirogronowego.

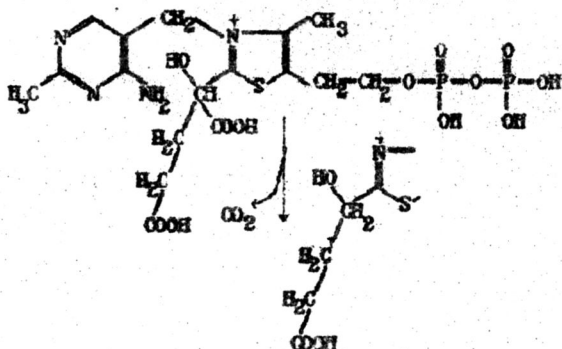
KOENZYMY



2. Przenosi **GRUPE ALDEHYDU GLIKOLEWEGO** - w cyklu pentożowo fosforanowym jako koenzym TRANSKETOLAZY.



3. Przenosi **GRUPE SEMIALDEHYDU BURSZTYNOWEGO** (w cyklu KREBSA)

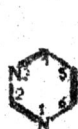


KWASY NUKLEINOWE

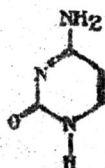
9. KWASY NUKLEINOWE

KWASY NUKLEINOWE są wielocząsteczkowymi substancjami złożonymi, dającymi po całkowitej hydrolizie heterocykliczne **ZASADY AZOTOWE**, (pirymidynowe i purynowe), **PENTOZE** (rybozę bądź dezoksyrybozę) oraz **KWAS FOSFOROWY**.

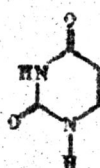
ZASADY PIRYMIDYNOWE posiadają dwa atomy azotu w pierścieniu w pozycji 1, 3 wg numeracji ustalonej na Konwencji Genewskiej. Do najczęściej spotykanych w kwasach nukleinowych zasad pirymidynowych należą: **CYTOZYNA**, **TYMINA**, **URACYL**.



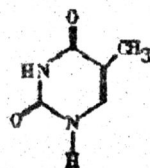
Zasada
pirymidynowa



Cytosyna
2-oksy-4-amino-
pirymidyna



Uracyl
2,4-dioxy-
pirymidyna



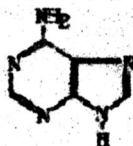
Timina
5-metylo-2,4-
dioksypirymidyna

Zasady te mogą występować w trzech formach tautomerycznych.

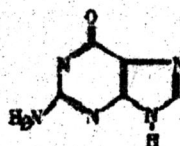
ZASADY PURYNOWE zbudowane są z dwóch pierścieni: pirymidynowego i imidazolowego, posiadają cztery atomy azotu w pozycjach oznaczonych 1, 3, 7, 9. Zasady purynowe występujące w kwasach nukleinowych to: **ADENINA** i **GUANINA**, a wśród produktów rozpadu znajdujemy **HPOKSANTYNE**, **KSANTYNE** i **KWAS MOCZOWY**.



Zasada
purynowa



Adenina

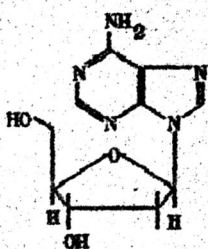


Guanina

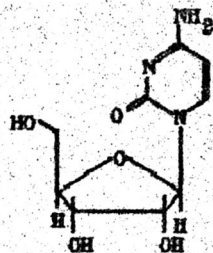
6-aminopuryna 2-amino-6-oksy-
puryna

KWASY NUKLEINOWE

Zasady azotowe łącząc się z cukrem rybozą lub deoksyrybozą tworzą **NUKLEOZYDY**.



Deoksyadenozyna

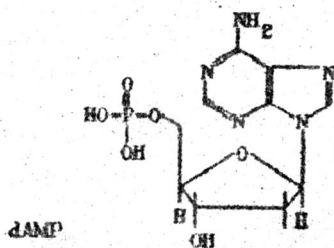


Cytidyna

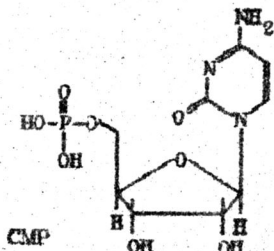
Wiązanie łączące zasadę azotową z cukrem nosi nazwę N-glikozydowego i łączy azot-1 zasady pirymidynowej bądź azot-9 zasady purynowej z C_{1'} cukru (w odróżnieniu od numeracji w pierścieniu, atomy węgla cukru oznaczają się cyframi od 1' do 5').

Nazwy nukleozydów tworzy się od nazw zasad - w przypadku zasad pirymidynowych dodaje się końcówkę - dyna, np. cyty-dyna, ury-dyna, tymi-dyna, a w przypadku zasad purynowych - zyna, np. adeno-zyna, gua-no-zyna, natomiast odpowiednia pochodna hipoksantyny nosi nazwę ino-zyny.

Nukleotydy powstają przez zestryfikowanie w pozycji 5'-węgla cukru reszta kwasu fosforowego.



Kwas deoksyadenozynomonofosforowy



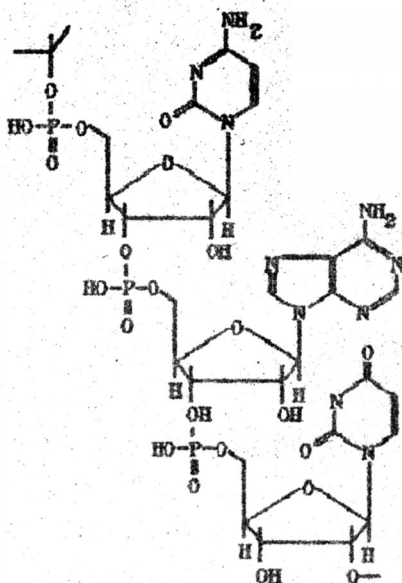
Kwas cytydynomonofosforowy

W identyczny sposób może powstać kwas tymidynomonofosforowy (TMP), kwas urydynomonofosforowy (UMP) oraz kwas guanozynomonofosforowy

KWASY NUKLEINOWE

(GMP). Związki te można również określić jako: tymidynomonofosforan, urydynomonofosforan itd.

Kwasy nukleinowe są wielkocząsteczkowymi polinukleotydami. Nukleotydy połączone są ze sobą w łańcuch przez resztę kwasu fosforowego wiązaniami diestrowymi w pozycji 3' i 5'.



Fragment wzoru kwasu rybonukleinowego (struktura I-rzędowa)

Fragment kwasu rybonukleinowego (struktura pierwszorzędowa).

Wśród kwasów nukleinowych rozróżniamy dwa typy: KWAS RYBONUKLEINOWY (RNA) I KWAS DEOKSYRYBONUKLEINOWY (DNA). Podstawową cechą strukturalną odróżniającą łańcuchy poliribo- od polideoksyrybonukleotydów jest występowanie w tych ostatnich cukru - deoksyrybozy (brak tlenu w pozycji 2'). Poza tym w kwasie deoksyrybonukleinowym występuje tymina, której miejsce w kwasie rybonukleinowym zajmuje uracyl. Cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego zbudowane są z dwóch skreślonych łańcuchów polinukleotydowych. Łańcuchy te są wzajemnie połączone wiązaniami wodorowymi.

KWASY NUKLEINOWE

Sekwencja zasad w obydwu łańcuchach jest komplementarna, w myśl REGUŁY KOMPLEMENTARNOSCI CHARGAFFA, tzn. istnieją warunki przestrzenne umożliwiające powstawanie mostków wodorowych między zasadami: **ADENINA** i **TYMINA** oraz **CYTOZyna** i **GUANINA**.

Kwasy rybonukleinowe występują w postaci jednołańcuchowych cząsteczek, chociaż w obrębie tego samego łańcucha poliryonukleotydowego mogą występować pewne odcinki wzajemnie komplementarne tworząc splecione struktury. Podobnie jak w DNA splety te są utrwalone wiązaniami wodorowymi między resztami adeniny i uracylu oraz cytozyny i guaniny. Między splecionymi fragmentami łańcucha występują pętle, w których znajdują się zasady purynowe i pirymidynowe nie powiązane wiązaniami wodorowymi.

Funkcje biologiczne kwasów nukleinowych : kwasy deoksyrybonukleinowe występują głównie w jądrze komórkowym wchodząc w skład chromosomów i są odpowiedzialne za przekazywanie informacji genetycznej z komórek macierzystych do potomnych. Doniesienia ostatnich lat wskazują na obecność DNA także w innych strukturach komórkowych - w mitochondriach i chloroplastach.

W komórce są trzy rodzaje kwasu rybonukleinowego, mianowicie: rybosomalny (r-RNA) informacyjny (m-RNA) i transportujący (rozpuszczalny) - przenoszący aminokwasy (t-RNA lub s-RNA). Podział ten jest związany z funkcją poszczególnych kwasów rybonukleinowych w biosyntezie białek. Z chemicznego punktu widzenia te trzy rodzaje RNA różnią się przede wszystkim ciężarem cząsteczkowym i składem zasad. Rybosomalny RNA ma ciężar cząsteczkowy ok. 500.000 do miliona. Informacyjne kwasy rybonukleinowe charakteryzują się ciężarem cząsteczkowym w granicach kilkuset tysięcy, a pod względem składu zasad są komplementarne do odpowiedniego odcinka nici DNA, na którym odbywa się ich synteza. Przenośnikowe kwasy rybonukleinowe mają znacznie niższe ciężary cząsteczkowe, w granicach 25.000 - 30.000. Są one rozpuszczalne w cytoplazmie i stąd nazywane są również rozpuszczalnymi RNA.

KWASY NUKLEINOWE - ĆWICZENIA

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA



30

IZOLOWANIE RNA Z DROŻDŻY

ODCZYNNIKI:

1. 20% kwas trojchlorooctowy
2. Aceton
3. Mieszanina acetonu i eteru (1 : 1)
4. 96% alkohol etylowy
5. 10% NaCl

WYKONANIE: Odmierzyć 2 g świeżych drożdży piekarskich do próbki wirowniczej o pojemności ok. 12 cm³, dodać 3 cm³ wody destylowanej i wymieszać bagietką celem otrzymania zawiesiny. Probówkę wstawić do zlewki z lodem. Po upływie kilku minut dodać 6 cm³ 20% CCl₃COOH (TCA) oziębionego do ok. 0°C. Zawartość próbki wymieszać starannie bagietką, po upływie 15 min. wirować w ciągu 10 min. przy 3000 obr./min. Płyn z nad osadu (supernatant), zawierający kwasorozpuszczalne związki drobnocząsteczkowe odrzuca się, a probówkę z osadem ponownie umieszcza się w zlewce z lodem. Celem odmycia CCl₃COOH oraz związków lipidowych do osadu dodaje się 8 cm³ acetonu, uprzednio oziębionego do 0°C, miesza się bagietką i po upływie 5 min. wiruje ok. 8 min. przy 2000 obr./min. Supernatant wylewa się, a osad ponownie przemywa się 8 cm³ acetonu i wiruje. Po raz trzeci przemywa się osad 8 cm³ mieszaniny acetonu i eteru i odstawia na 15 min. w temp. pokojowej. Następnie wiruje się przez 10 min. przy 3000 obr./min. Supernatant odrzuca się, a osad suszy w strumieniu ciepłego powietrza. Do wysuszonego osadu dodaje się 3 cm³ 10% NaCl i miesza starannie bagietką. Probówkę zamyka się korkiem z chłodniczą powietrzną i umieszcza we wrzącej łaźni wodnej na 40 min. Po zakończeniu ekstrakcji zawartość próbki należy ochłodzić, a następnie odwirować. Supernatant zawierający kwasy nukleinowe przelać do suchej próbki i wstawić na 5 min. do zlewki z lodem. Następnie dodać 7 cm³ oziębionego do 0°C etanolu w celu wytrącenia RNA, dokładnie wymieszać zawartość próbki i pozostawić na 15 min. w temp. ok. 0°C. Po tym czasie wirować ok. 10 min. przy 3000 obr./min. Supernatant odrzucić. Osad RNA rozpuścić w 10 ml H₂O i przechować w lodówce do następnego ćwiczenia.

KWASY NUKLEINOWE - ĆWICZENIA



31

ILÓŚCIOWE OZNACZANIE RNA DROŹDZY NA PODSTAWIE ZAWARTOŚCI RYBOZY

ZASADA: Do oznaczania rybozy i dezoksyrybozy stosuje się reakcje barwne, odpowiednio z orcyńą i difenylloaminą. Na uwagę zasługuje fakt, że absorbancje roztworów zawierających równoważne ilości wolnej rybozy i RNA różnią się znacznie. Wynika to z tego, że z orcyńą reagują reszty rybozy, od których została odszczepiona zasada azotowa. W większości metod podczas wywoływania barwy ulegają hydrolizie jedynie nukleotydy purynowe, natomiast pirymidynowe pozostają nietknięte. Stąd absorbancje próbek zawierających RNA są niższe niż wynikałoby to z zawartości rybozy i zależą od składu nukleotydowego, ściślej od stosunku puryn do pirymidyn. Uwagi te dotyczą również oznaczania deoksyrybozy.

Otrzymane wyniki oznaczeń RNA i DNA na podstawie fosforu bądź rybozy i deoksyrybozy odnosi się do ilości materiału biologicznego w próbce i oblicza się zawartość tych związków w całej tkance.

ODCZYNNIKI:

1. Standardowy roztwór RNA drożdży $300 \mu\text{g}/\text{cm}^3$
2. 6% alkoholowy roztwór orcyny
3. Roztwór chlorku żelazowego w kwasie solnym (2 cm^3 10% roztworu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 400 cm^3 stężonego kwasu solnego).

WYKRESLENIE KRZYWEJ WZORCOWEJ.

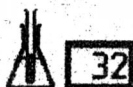
Ponumerować próbki od 1 do 10. Do próbki 1 i 2: 3 i 4: 5 i 6: 7 i 8 dodać odpowiednio 0,5, 1, 1,0, 2,0 i 3,0 cm^3 roztworu standardowego RNA. Do próbek 9 i 10 odmierzyć 3 cm^3 wody destylowanej (próba ślepa). Do próbek 1 - 6 dodać taką ilość wody, by sumaryczna objętość wynosiła również 3 cm^3 np. do próbki 1 i 2 dodać po 2,5 cm^3 wody, 3 i 4 po 2,0 cm^3 wody itd. Do wszystkich próbek dodać po 6 cm^3 roztworu chlorku żelazowego i 0,4 cm^3 roztworu orcyny. Po wymieszaniu próbki wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 20 min. Po oziębieniu oznaczyć absorbancję przy długości fali 660 nm. Wykreślić krzywą wzorcową.

WYKONANIE OZNACZENIA zawartości RNA. Do dwóch próbek odmierzyć po 1 cm^3 roztworu RNA i po 2 cm^3 wody. Dalsze postępowanie jest identyczne

KWASY NUKLEINOWE - ĆWICZENIA

Jak przy przygotowaniu krzywej wzorcowej. Po pomiarze absorbancji w 660 nm odczytać z krzywej ilość RNA znajdującą się w oznaczonych próbkach. Średnia z dwóch wyników ($\bar{x}$) odpowiada ilości RNA znajdującego się w 1 cm³ roztworu RNA. Stąd ilość RNA (x_{RN}) znajdującą się w całości roztworu (v), na podstawie oznaczenia rybozy wynosi :

$$x_{RNA} = \frac{\bar{x} \cdot v}{1000} \text{ mg}$$



ODRÓŻNIANIE RNA OD DNA

REAKCJA Z ORCYNĄ

WYKONANIE: Do 2 próbek zawierających po 1 cm³ 0,1% roztworów RNA i DNA dodać równą objętość 6% roztworu orcyny i umieścić próbki we wrzącej łaźni wodnej na 15 min. W próbce zawierającej RNA powstaje zielone zabarwienie. DNA daje około 10-krotnie słabszy odczyn z roztworem orcyny.

ZASADA: Pentozy wolne oraz związane w kwasach nukleinowych ogrzewane ze stężonym HCl przechodzą w furfural, który z orcyną i jonami Fe⁺³ tworzy trwały kompleks o zielonej barwie.

REAKCJA Z DIFENYLOAMINĄ

WYKONANIE: Do próbek zawierających po 1 cm³ 0,1% roztworów RNA i DNA dodać podwójną objętość roztworu dwufenyloaminy. Probówki umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 10 min. W próbce zawierającej DNA powstaje niebieskie zabarwienie. Barwny kompleks z dwufenyloaminą daje deoksyryboza. RNA nie wykazuje dodatniego odczynu w próbie dwufenyloaminowej.

KWASY NUKLEINOWE - ĆWICZENIA

REAKCJA FEULGENA NA DEOKSYRYBOZE.

WYKONANIE: Do 1 cm³ 0,1% roztworu DNA dodać 5 - 6 kropli 1 N HCl i probówkę umieścić we wrzącej łaźni wodnej na okres 5 min. Po oziębieniu doprowadzić pH roztworu do 5 za pomocą 0,1 N NaOH. Następnie dodać 2 cm³ odczynnika Schiffa. Powstaje czerwone zabarwienie wskazujące na obecność deoksyrybozy. Powtórzyć powyższą reakcję z roztworem RNA.

ODCZYNNIK SCHIFFA (0,2 g fuksyny rozpuścić na gorąco w 120 cm³ wody. Po ostudzeniu dodać stopniowo 10% roztworu NaHSO₃, aż do odbarwienia roztworu).

ZASADA: Reakcja Feulgena z odczynnikiem Schiffa jest szeroko stosowana w metodach histochemicznych do wybiórczego wybarwienia jąder i chromosomów. Deoksyryboza uwolniona w kwasowym środowisku z DNA (hydroliza wiązania N-glikozydowego i uwolnienie grupy aldehydowej pentozy) daje dodatni odczyn z odczynnikiem Schiffa.



33

KWASNA HYDROLIZA KWASÓW NUKLEINOWYCH

WYKONANIE: 10 cm³ 0,1% roztworu RNA ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej w ciągu 45 minut z 10 cm³ 10% H₂SO₄. Uzyskany hydrolizat służy do dalszych prób.

ZASADA: Kwasy nukleinowe ogrzewane z mocnymi kwasami nieorganicznymi ulegają hydrolizie do wolnych zasad purynowych i nukleotydów pirymidynowych. W celu rozłożenia RNA stosuje się ogrzewanie z 1 N HCl lub 10% H₂SO₄ w 100°C.



34

WIKRYWANIE PENTOZY

WYKONANIE: Do 1 cm³ hydrolizatu RNA dodać 1 cm³ stężonego HCl i kryształek floroglucyny. Roztwór ogrzać do wrzenia. Powstaje czerwone zabarwienie, świadczące o obecności pentozy. Mechanizm reakcji: patrz cukry.

KWASY NUKLEINOWE - ĆWICZENIA



35

WYKRYWANIE KWASU FOSFOROWEGO

WYKONANIE: $0,5\text{ cm}^3$ hydrolizatu kwasu nukleinowego zobojętnić roztworem amoniaku. Następnie dodać $0,5\text{ cm}^3$ stężonego HNO_3 i 2 cm^3 roztworu molibdenianu amonowego. Zawartość próbówki ogrzać do wrzenia. Wytrąca się żółty osad fosfomolibdenianu amonowego.



36

WYKRYWANIE ZASAD AZOTOWYCH (PURYN)

WYKONANIE: (1) Do 1 cm^3 hydrolizatu RNA dodać roztworu amoniaku do słabo alkalicznego odczynu. Jeśli wystąpi zmętnienie - przesączyć, a następnie dodać 3 cm^3 amoniakalnego roztworu wodorotlenku srebra. Wytrąca się osad nierozpuszczalnych w amoniaku soli srebrowych puryn.

WYKONANIE: (2) Do 1 cm^3 kwaśnego hydrolizatu RNA dodawać 1 N NaOH do słabo kwaśnego oddziaływania wobec papierka Kongo. Roztwór zagotować, dodać 4 - 6 kropli $1\% \text{ CuSO}_4$ i ostrożnie, kroplami dodać nasycony roztwór NaHSO_4 .

ZASADA: Kwaśny siarczyn sodu redukuje jony Cu^{2+} do Cu^+ , które z purynami tworzą nierozpuszczalne sole miedziawe.

LIPIDY - TŁUSZCZE PROSTE

10. LIPIDY

Lipidy są związkami nierozpuszczalnymi w wodzie. Ta ich charakterystyczna cecha wynika z apolarnej struktury cząsteczkowej. Związki te rozpuszczają się zatem dobrze w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych - w eterze, chloroformie, czterochlorku węgla, dwusiarczku węgla, benzenie, toluenie, w nieznacznie mniejszym stopniu w etanolu i metanolu.

Apolarny charakter cząsteczek jest przyczyną występowania w płynach ustrojowych organizmu lipidów w postaci odrębnej fazy - EMULSJI. W organizmach znaczna część lipidów występuje jako materiał zapasowy, są to przede wszystkim tłuszcze zapasowe służące głównie jako materiał energetyczny. TŁUSZCZE ZAPASOWE odkładane są przeważnie w tkance podskórnej i w okolicach jamy brzusznej (te służą również jako materiał izolacyjny). Pewna część lipidów wchodzi w skład elementów strukturalnych, są to tzw. LIPIDY NARZĄDOWE. W znacznych ilościach występują we włóknach nerwowych, w tkance mózgowej, są składnikami błon komórkowych gdzie pełnią ważną rolę związaną z selektywną przepuszczalnością. Ponadto są ważnymi składnikami pożywienia, nie tylko ze względu na ich dużą wartość energetyczną, ale również dlatego, iż znajdują się w nich witaminy rozpuszczalne w tłuszczach.

Lipidy dzieli się na TŁUSZCZE PROSTE (tłuszcze właściwe i woski), w skład których wchodzi alkohol i kwasy tłuszczowe oraz TŁUSZCZE ZŁOŻONE, które obok alkoholu i kwasów tłuszczowych zawierają jeszcze inne składniki np. kwase fosforowe, choline czy galaktozę.

10.1. TŁUSZCZE PROSTE

10.1.1 TŁUSZCZE WŁAŚCIWE

TŁUSZCZE WŁAŚCIWE SĄ ESTRAMI GLICEROLU (trójwodorotlenowy alkohol) i WYŻSZYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH (jedenokarboksylowe alifatyczne kwasy organiczne). Najczęściej są mieszaniną trójglicerydów różnych kwasów tłuszczowych. Kwasy tłuszczowe występujące w tłuszczach naturalnych zawierają zwykle parzystą ilość atomów węgla, co jest wynikiem ich syntezy z dwuwęglowych fragmentów.

Jednym z nielicznych kwasów o nieparzystej liczbie atomów węgla.

LIPIDY - TŁUSZCZE PROSTE

wyodrębnionym z tłuszczów jest KWAS IZOWALERIANOWY ($\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH}$. Kwas ten w znacznych ilościach występuje w tranach. Ponadto kwasy tłuszczowe mogą być NASYCONE (bez wiązań podwójnych) (Tab.), bądź NIE-NASYCONE (zawierają jedno lub więcej wiązań podwójnych) (Tab.). Właściwości fizyczne tłuszczu zależą od rodzaju wchodzących w jego skład kwasów tłuszczowych i stopnia ich nienasycenia tj. od liczby wiązań podwójnych.

Obecność wiązań podwójnych obniża temperaturę topnienia np. dla kwasów 18 węglowych z $+70^\circ\text{C}$ dla kwasu stearynowego, do $+13^\circ\text{C}$ dla kwasu oleinowego. Tłuszcze o dużej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych są ciekłe, oleiste. W różnych tłuszczach występują kwasy tłuszczowe o łańcuchach zbudowanych z 4 do 26 atomów węgla. Pierwsze z nich mają konsystencję płynną, im łańcuch jest dłuższy tym wyższa staje się ich temperatura topnienia.

TABELA

NASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE

(wg. H.A. Harpera "Zarys Chemii Fizjologicznej" PZWL 1983 str. 15)

NAZWA KWASU	WZOR ZWIĄZKU	Temp. top. $^\circ\text{C}$	WYSTĘPOWANIE
MASŁOWY	$\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$	- 7,9	W pewnych tłuszczach w małych ilościach (związki w masie) Produkt fermentacji w żołądku przeżuwaczy.
KAPRONOWY (heksenowy)	$\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$	- 3,9	
KAPRYLOWY (oktanowy)	$\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$	+ 16,7	W wielu tłuszczach w małych ilościach (łącznie z masłem), zwłaszcza w tłuszczach roślinnych.
KAPRYNOWY (dekanowy)	$\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{COOH}$	+ 31,6	
LAURYNOWY	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{COOH}$	+ 44,2	Olbrót, cynamon, nasiona palmy, olej kokosowy, owoc wawrzynu
MIRYSTYNOWY	$\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{COOH}$	+ 53,9	Gałka muszkatołowa, nasiona palmy, olej kokosowy, mirt

LIPIDY - TŁUSZCZE PROSTE

PALMITYNOWY	$C_{15}H_{31}COOH$	+13,1	Powszechnie we wszystkich tłuszczach zwierzęcych i roślinnych.
STEARYNOWY	$C_{17}H_{35}COOH$	+69,6	
ARACHIDOWY	$C_{19}H_{39}COOH$	+75,3	Óleje z orzeszków ziemnych
BEHENOWY	$C_{21}H_{43}COOH$	+79,9	Nasiona
LIGNOCERYNOWY	$C_{23}H_{47}COOH$	+ 84,2	Cerebrozydy, olej z orzeszków ziemnych.
CEROTONOWY	$C_{25}H_{51}COOH$	+ 87,7	Tłuszcz wełny owczej

Pierwsze z podanych w Tab. kwasów tłuszczowych nasyconych są rozpuszczalne lub częściowo rozpuszczalne w wodzie, są lotne z parą wodną i posiadają charakterystyczny zapach. Kwasy zawierające w łańcuchu więcej niż 12 atomów węgla są nierozpuszczalne w wodzie, są nielotne i nie posiadają specyficznego zapachu. Grupa karboksylowa kwasu tłuszczowego jest polarna i dzięki temu wykazuje duże powinowactwo do wody, natomiast alifatyczny łańcuch ma charakter apolarny i jest hydrofobowy. Dzięki temu właśnie kwasy tłuszczowe o krótkich łańcuchach, w których polarna grupa karboksylowa ma przewagę nad krótkim apolarnym łańcuchem węglowodorowym, są rozpuszczalne w wodzie.

TABELA

NENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE

(wg. E. Filipowicza, "Biochemia t.I", PWN 1973 str. 320)

NAZWA KWASU	IŁOŚĆ PODWOJNYCH WIĄZAŃ	WZÓR ZWIĄZKU	Temp. top. °C	WYSTĘPOWANIE
OLEOPALMITYNOWY	1	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7-COOH$	0	tłuszcze ssaków
OLEINOWY (oleje- ry)	1	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7-COOH$	+13,4	tłuszcze roślinne i ssaków

LIPIDY - TŁUSZCZE PROSTE

ERUKOWY	1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH}$ 21	+34,7	oleje roślinne
MERWONOWY	1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}-\text{COOH}$ 23	+39,0	cerebro- zydy
LINOLOWY	2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH})_2-\text{COOH}$ 16	-5,0	oleje, trany, fosfatydy
LINOLENOWY	3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ 15	-11,0	olej liniany
ARACHIDONOWY	4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH})_4-\text{COOH}$ 15	-49,5	fosfatydy

Nienasycone kwasy tłuszczowe dzięki obecności wiązań podwójnych występują w postaciach **IZOMERYCZNYCH** które określają położenie łańcuchów w odniesieniu do płaszczyzny przeprowadzonej przez podwójne wiązanie.

Jeżeli oba fragmenty łańcucha mieszczą się po tej samej stronie płaszczyzny tworzy się odmiana **CIS** i przeciwnie - gdy są po obu stronach płaszczyzny tworzy się odmiana **TRANS**. Jako przykład tych diastereoizomerów mogą posłużyć KWAS OLEINOWY i ELADYNOWY.



KWAS OLEINOWY (ODMIANA CIS)



KWAS ELADYNOWY (ODMIANA TRANS)

W TŁUSZCZACH NATURALNYCH występuje tylko odmiana CIS. Z kwasów nienasyconych składnikami tłuszczów są głównie kwasy: oleinowy, linolowy i linolenowy.

Pośród kwasów tłuszczowych na uwagę zasługują także OKSYKWASY np.

KWAS CEREBRONOWY $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{CHOHCOOH}$ czy

KWAS OKSYNERWONOWY $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_{12}\text{CHOHCOOH}$.

które są składnikami glikolipidów.

Estrowa budowa estrowa nadaje tłuszczom odpowiedni charakter chemiczny. Związki te łatwo ulegają hydrolizie i to zarówno pod działaniem lipaz, przegrzanej pary wodnej i jonów wodorowych jak również pod działaniem wilgoci, światła, powietrza, a nawet przy udziale drobno-ustrojów. W wyniku tych czynników zachodzi proces, który NOSI NAZWĘ [JELCZENIA]: polega na utlenianiu nienasyconych kwasów tłuszczowych w wyniku czego tlen przyłącza się do podwójnych wiązań tworząc nadttlenki. W dalszym etapie łańcuchy ulegają rozerwaniu i w przypadku niższych kwasów tłuszczowych powstają [KETONY] z wyższych kwasów tłuszczowych powstają [ALDEHYDY]. Zjeżdżały tłuszcz poza specyficznym, nieprzyjemnym zapachem obniżoną wartość odżywczą.

10.1.2. WOSKI

Woski występują zarówno w organizmach zwierzęcych jak i roślinnych pełnią głównie rolę ochronną i budulcową. Pokrywają cienką warstwą zewnętrzne powłoki organizmów zwierzęcych i roślinnych chroniąc je przed odparowywaniem wody, a więc przed nadmierną jej utratą. To ochronne działanie wosków związane jest z ich nierozpuszczalnością w wodzie i dużą odpornością na działanie czynników chemicznych.

Pod względem budowy chemicznej woski są złożonymi mieszaninami estrow wyższych jednowodorotlenowych, jednonienasyconych alkoholi o 16 - 31 atomach węgla i jednokarboksylowych nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Charakterystyczną cechą ich budowy jest to, że często kwas i alkohol wchodzące w skład wosku, mają tę samą ilość atomów węgla.

LIPIDY - TŁUSZCZE ZŁOŻONE

10.2. TŁUSZCZE ZŁOŻONE

Tłuszcze złożone w znacznych ilościach występują w organizmach zwierzęcych. W połączeniu z białkami tworzą błony półprzepuszczalne występując jako błony komórkowe, jądrowe czy mitochondrialne. Ponadto wchodzi one w skład tkanki nerwowej i mózgu zwierząt, znajdują się w krwi, limfie, wątrobie, mięśniach i żółtku jaj.

ZE WZGLĘDU NA RODZAJ ALKOHOLU (GLICEROL, SFINGOZYNA) wchodzącego w skład cząsteczki i składnik dodatkowy, tłuszcze złożone, dzieli się na:

1. FOSFOLIPIDY GLICEROŁOWE (FOSFOGLICERYDY)

1. KWASY FOSFATYDOWE
2. LECYTYNY (fosfatydylocholiny)
3. KEFALINY A/ (fosfatydyloetanolaminy)
B/ (fosfatydyloseryny)
4. FOSFOINOZYTYDY
5. PLAZMALOGENY
6. KARDIOLIPINY
7. LIZOLECYTYNY

2. SFINGOLIPIDY

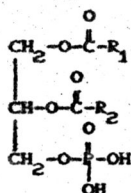
1. SFINGOMIELINY
2. CEREBROZYDY
3. SULFOLIPIDY
4. GANGLIOZYDY

10.2.1. FOSFOGLICERYDY

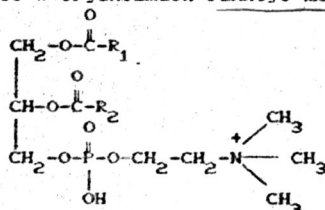
Fosfoglicerydy zbudowane są z glicerolu, którego dwie grupy hydroksylowe zestryfikowane są resztami, kwasów tłuszczowych, a trzecia kwasem fosforowym.

LIPIDY - TŁUSZCZE ZŁOŻONE

Do takich fosfoglicerydów należy **KWAS FOSFATYDOWY**

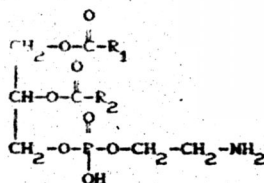


ważny związek pośredni w syntezie trójgliceroli i fosfolipidów. W lecytynach kwas fosforowy zesterylizowany jest **CHOLINA**. Są to związki pełniące w organizmach funkcje metaboliczne i strukturalne.

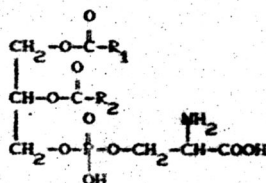


FOSFATYDYLOCHOLINA
(LECYTYNA)

Fosfoglicerydy zawierające kolaminę (etanoloaminę) lub serynę nazywane są **KEFALINAMI**.



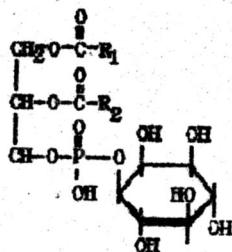
FOSFATYDYLOETANOLOAMINA
(KEFALINA KOLAMINOWA)



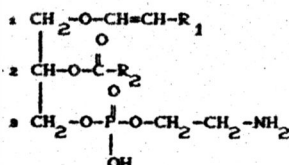
FOSFATYDYLOSERYNA
(KEFALINA SERYNOWA -
- SERYNOKEFALINA)

LIPIDY - TŁUSZCZE ZŁOŻONE

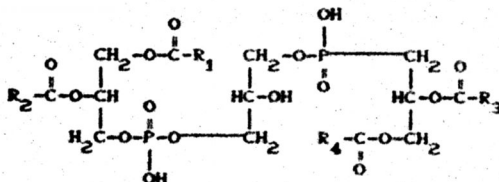
FOSFOINOZYTYDY znajdują się w tkance mózgowej, stwierdzono także ich obecność w niektórych tkankach roślinnych. W związkach tych reszta kwasu fosforowego zestryfikowana jest grupą hydroksylową INOZYTOLU.



PLAZMALOGENY przy atomie węgla C₁ glicerolu zamiast wiązania estrowego mają wiązanie eterowe z formą enolową aldehydu. Drugi atom węgla glicerolu zestryfikowany jest nienasyconym kwasem tłuszczowym. Związki te występują w tkance mózgowej i mięśniowej.

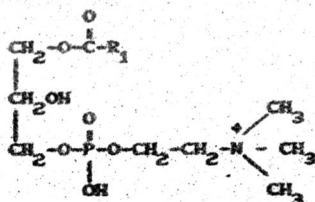


KARDIOLIPINY są składnikami błon mitochondrialnych. Powstają przez połączenie dwóch cząsteczek kwasu fosfatydowego z grupami -CH₂OH glicerolu.



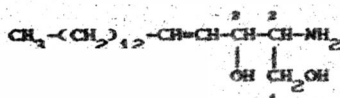
LIPIDY - TŁUSZCZE ZŁOŻONE

LIZOLECYTINY posiadają tylko jeden rodnik acylowy.

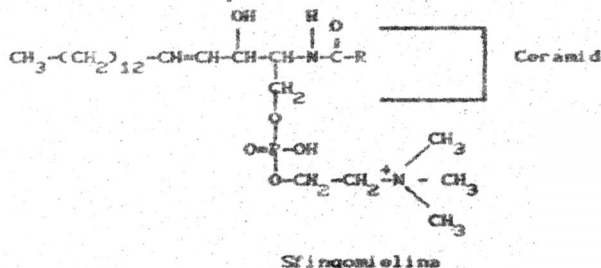


10.2.2. SFINGOLIPIDY

Sfingolipidy zamiast GLICEROLU zawieraja diwodorotlenowy amino-
alkohol - [SFINGOZYNE]



Gdy kwas tłuszczowy jest związany peptydowo z grupą aminową C₂ SFINGOZINY a do C₁ przylacza się estrowo FOSFORAN CHOLINY - powstają SFINGOLIPIDY. Związki te w znacznych ilościach stwierdzono w mózgu, w ośrodkach mielinowych otaczających włókna nerwowe, a także w śledzionie.



CEREBROZYDY, SULFOLIPIDY i GANGLIOZYDY określane są mianem GLIKO-

LIPIDY - STERYDY, KAROTENOWCE, WIT.

LIPIDOW. Związki te pod względem budowy podobne są do sfingomieliny, różnią się tylko podstawnikiem przy C₁ SFINGOZYNA zamiast, fosfocholiny posiada glikozydowo związana reszta węglowodanowa lub jej siarczanowa pochodna.

Składnikiem cukrowym cerebrozydów jest najczęściej GALAKTOZA lub GLUKOZA, sulfolipidy zawierają SIARCZAN GALAKTOZY zaś w gangliozydach w skład reszty cukrowej wchodzi HEKSOZY (glukoza i galaktoza), heksozamina i kwas neuraminowy. Składnikiem wszystkich sfingolipidów jest ugrupowanie zwane CERAMIDEM, powstałe z połączenia sfingozyiny z kwasem tłuszczowym przez grupę aminową.

10.3. STERYDY, KAROTENOWCE I WITAMINY ROZPUSTCZALNE W TŁUSZCZACH

W tłuszczach naturalnych występuje także pewna ilość sterydów. Typowym PRZEDSTAWICIELEM STERYDOW ZWIERZĘCYCH JEST CHOLESTEROL. Występuje on w estrowym połączeniu z wyższymi kwasami tłuszczowymi. Jedynie w tkance nerwowej, kamieniach żółciowych i częściowo w osoczu cholesterol spotyka się w stanie wolnym.

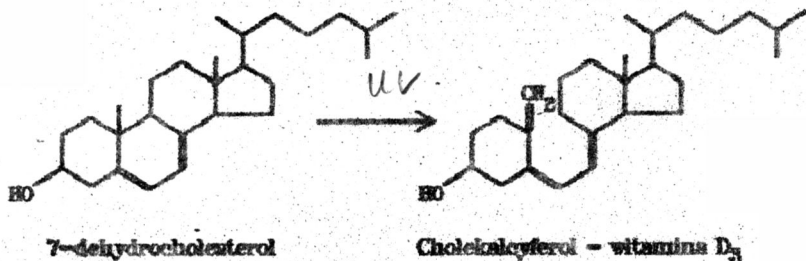
ORGANIZM DOROSŁEGO CZŁOWIEKA ZAWIERA OKOŁO 200 g CHOLESTEROLU. Znaczna jego ilość występuje w nadnerczach i w tkance mózgowej. W połączeniu z fosfolipidami jest składnikiem błon komórkowych. W osoczu występuje około 200 mg% (130-280mg%) (3,2 do 8,5 mmol/dm³) cholesterolu, w większości związany jest z lipidami (głównie z kwasem palmitynowym i oleinowym) i lipoproteidami.

Występujący w organizmie cholesterol w przeważającej ilości jest pochodzenia endogennego, pewna jego część dostarczana jest do organizmu z pokarmem. Dziennie około 2 g cholesterolu dostaje się do jelita wraz z żółcią, około 0,8 g przedostaje się do jelita grubego i jako KOPROSTEROL lub CHOLESTANOL jest wydalana z kałem. W stanach patologicznych (cukrzyca, nadciśnienie) i przy głodzeniu organizmu stężenie cholesterolu może WZROŚNĄĆ kilkakrotnie. Niskie stężenie cholesterolu w chorobach zakaźnych wywołane jest zwykle spadkiem ilości estrów cholesterolu w wyniku uszkodzenia wątroby czy niedokrwistości hemolitycznej.

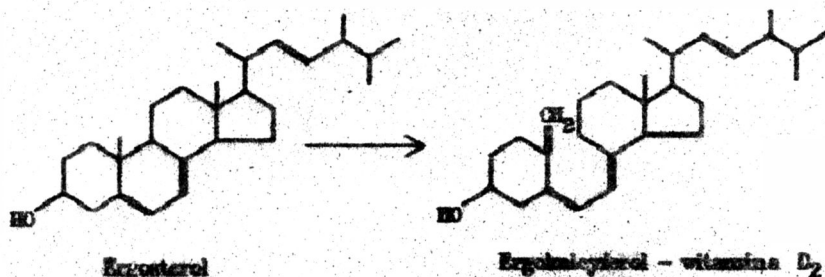
CHOLESTEROL jest prekursorem KWASOW ŻÓŁCIOWYCH oraz HORMONÓW STERYDOWYCH. W organizmie zwierzęcym, szczególnie w wątrobie i skórze

LIPIDY - STERYDY, KAROTENOWCE, WIT.

część cholesterolu ulega utlenieniu do 7-DENYDROCHOLESTEROLU. Związek ten uważany jest za prowitaminę, gdyż pod wpływem promieni ultrafioletowych przechodzi w **CHOLEKALCYFEROL** czyli **WITAMINĘ D₃**.



Prowitamina jest także **ERGOSTEROL** przechodzący pod wpływem promieniowania UV w **ERGOKALCYFEROL** czyli **witaminę D₂**.

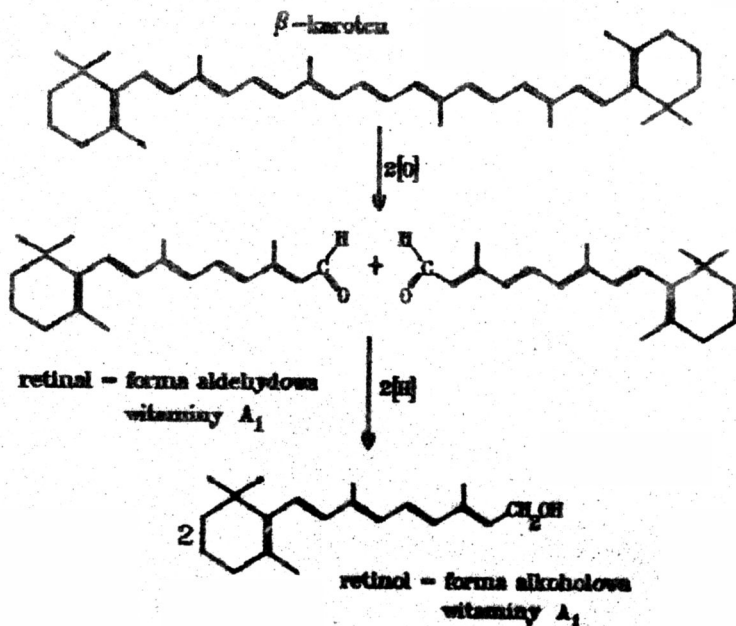


WITAMINY D zwiększają wchłanianie wapnia i fosforanów z jelita, wpływają także na procesy wapnienia kości i gospodarowanie fosforanami przez nerki. Witamina D₃ jest silną witaminą przeciwkrzywiczą dla człowieka. Witaminy z grupy D nie są jednak sterydami. Obok witamin A, E i K tworzą szereg witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Witamina A występuje łącznie z witaminą D najczęściej w oleju otrzymywanym z wa-

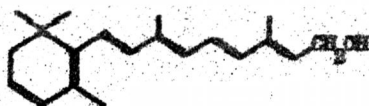
LIPIDY - STERYDY, KAROTENOWCE, WIT.

troby rybiej (tłacz). Duża ilość tej witaminy występuje także w wątrobie innych zwierząt, mleku, maśle, żółtku jaja kurzego. Provitaminami są związki z grupy karotenoidów. KAROTENOIDY obejmują liczną grupę związków, głównie barwników roślinnych i zwierzęcych, których wspólnym elementem budulcowym jest **IZOPREN** lub produkty jego uwodornienia. Charakterystycznymi ich barwami są żółte, pomarańczowe i czerwone. Barwa uwarunkowana jest obecnością sprzężonych wiązań podwójnych.

Najaktywniejszym z tej grupy prowitamin jest **β -KAROTEN** który w wątrobie u ludzi ulega przemianom w **WITAMINIE A₁**

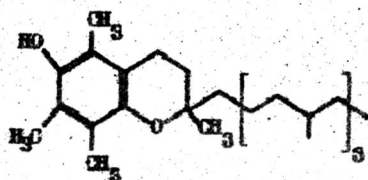


RETINOL występuje tylko w świecie zwierząt (w wątrobie, nerkach, płucach i tkance tłuszczowej), przede wszystkim w postaci estrów z wyższymi kwasami tłuszczowymi. Znana jest także witamina **A₂** (3-dehydroretinol); aktywność jej wynosi 40% aktywności retinolu.



3-dehydroretinol
witamina A₂

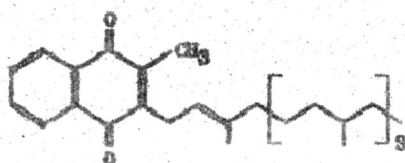
WITAMINY E I K obok ubichinonów należą do związków poliprenoidowych. Aktywność witaminy E przypisuje się głównie **α-TOKOFEROLOWI**. Pozostałe tokoferole (β i γ) oraz tokotrienole wykazują dużo mniejsze aktywności biologiczne wynoszące 1-50% aktywności α-tokoferolu.



α-Tokoferol - witamina E

WITAMINA E wykazuje ochronne działanie przed utlenieniem, głównie nienasyconych kwasów tłuszczowych. Istnieje ścisła zależność zapotrzebowania organizmu na witaminę E od spożycia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

Najlepiej poznana funkcja **WITAMINY K** jest katalizowanie syntezy **PROTROMBINY** przez wątrobę, bierze także udział w wielu miejscach metabolizmu wapnia. Rozróżniamy **WITAMINĘ K₁** czyli **FILLOCHINON** lub **FITONADION**, oraz **WITAMINĘ K₂** czyli **MENACHINON**. Znane są także syntetyczne związki np. **MENADION** wykazujące aktywność witaminy K.



**Mentochinon (Mentochinon) -
witamina K₁**

10.4. REAKCJE CHARAKTERYSTYCZNE

ROZPUSSZCZALNOŚĆ TŁUSZCZÓW

WYKONANIE: Do 3 probówek zawierających po 1 cm³ etanolu, eteru i chloroformu dodajemy odrobinę tłuszczu np. smalcu, łożu, oliwy. Stwierdzamy różnice w rozpuszczalności.

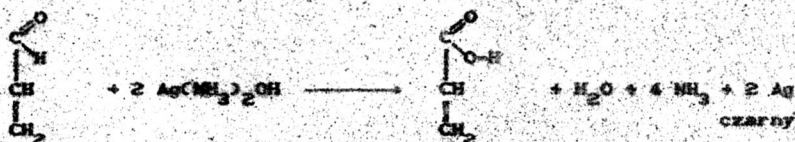
Tłuszcze łatwo rozpuszczają się w eterze i chloroformie, trudno w etanolu.

OTRZYMYWANIE AKROLEINY

WYKONANIE: Do kropli oleju w probówce dodajemy szczyptę krystalicznego kwasnego siarczany potasowego - KHSO₄. Po ogrzaniu probówki wytwarza się po pewnym czasie akroleina, którą poznajemy po przykrym zapachu, lub też możemy rozpoznać za pomocą skrawka bibuły umoczonego w amoniakalnym roztworze AgOH - pasek bibuły czernieje.

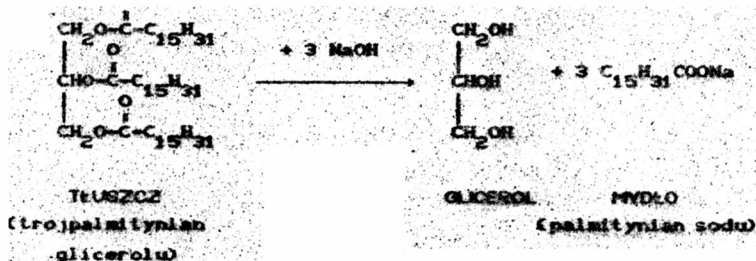


LIPIDY - ONCEONA



OTRZYMYWANIE MYDŁA

WYKONANIE: W parownicze porcelanowej ogrzewamy 3 cm^3 oliwy, a następnie dodajemy 5 cm^3 30% NaOH i 3 cm^3 etanolu. Podgrzewając łącznie, mieszamy przez 1 minutę, następnie dodajemy ok. 150 cm^3 wrzącej wody, mieszamy tak długo (cały czas podgrzewając), aż otrzymane mydło rozpuści się zupełnie. Uzyskane mydło zachowujemy do dalszych doświadczeń.



WISALANIE MYDŁA

WYKONANIE: Do ok. 5 cm³ roztworu mydła (z poprzedniego doświadczenia) dodajemy NaCl (in subst.) aż do nasycenia. Wyrzuci się osad mydła. Płyn snad osadu siewamy, a do osadu dodajemy wody destylowanej - mydło rozpущa się.

ZASADA: Mydła w większych stężeniach tworzą micelle splecione hydrofobowymi łańcuchami; reszty kwasów tłuszczowych, otoczone wystającymi na zewnątrz hydrofilnymi grupami polarnymi. Duże micelle otoczone cząsteczkami wody tworzą roztwory koloidalne. Dodanie do nich dużej ilości soli, dobrze rozpuszczalnych w wodzie, powoduje dehydratację miceli.

LIPIDY - EMULGOWANIE

Znaczny nadmiar jonów w środowisku zobojętnia ładunki zgrupowane na powierzchni miceli. Pozbawiona otoczki wodnej i odpychających się jednoimiennych ładunków, cząsteczki koloidu wypadają z roztworu. Zjawisko tego typu zaliczamy do procesów wytrącania.



OTRZYMYWANIE MYDŁA NIEROZPUSTCZALNEGO

WYKONANIE: Do trzech probówek wlewamy po 1 cm^3 roztworu mydła i kolejno dodajemy po 1 cm^3 do pierwszej probówki - roztworu CaCl_2 , do drugiej - roztworu BaCl_2 , do trzeciej roztworu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. Tworzą się osady nierozpuszczalnych mydeł: wapniowego, barowego i ołowianego. Również z roztworu mydeł rozpuszczalnych (sodowych i potasowych) pod wpływem jonów Ca^{++} , Ba^{++} , Pb^{++} wypadają osady mydeł nierozpuszczalnych w wodzie, np. $(\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COO})_2\text{Pb}$.



OTRZYMYWANIE EMULSJI TŁUSZCZU

WYKONANIE: Do kilku kropli oleju dodajemy 5 cm^3 wody i silnie wstrząsamy probówkę, tworzy się emulsja tłuszczu, która jest niestwała. Do takiej samej ilości oleju i wody dodajemy 1 cm^3 roztworu mydła, probówkę silnie wstrząsamy, tworzy się trwała emulsja tłuszczu.

Mydła tworzą w wodzie w większych stężeniach micelle, które zamykają w swoim wnętrzu kulki tłuszczu, do których przenikają grupy hydrofobowe (lipofilne). Umożliwia to tłuszczom rozproszenie się w wodnym roztworze mydła w postaci bardzo drobnych kuleczek (emulsja trwała).



WYDZIELANIE WOLNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

WYKONANIE: Do ^{probówki} 5 cm^3 mydła (roztworu mydła z dod. 3) dodajemy kroplami ^{2K} stężony kwas siarkowy, aż roztwór wykazuje odczyn kwaśny. ^{2m/100g} Roztwór ^{2K} natychmiast z powodu wydzielania się wolnych kwasów tłuszczowych. Mieszaninę ogrzewamy do wrzenia przez kilka minut. Kwasy tłuszczowe ^{2K} zbierają się na powierzchni płynu, a po ostygnięciu zastygają w jednolity plaster.

ZASADA: Wyższe kwasy tłuszczowe są słabymi kwasami. Dodanie do roztworu rozpuszczalnych mydeł mocnych kwasów nieorganicznych, powoduje

LIPIDY - ĆWICZENIA

cofnięcie dysocjacji grupy karboksylowej i powstanie niedzysocjowanego, nierozpuszczalnego w wodzie kwasu tłuszczowego.



44

WYKAZANE OBECNOŚCI NENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

A

WYKONANIE: Do próbki dać 2 krople oliwy i 5 cm^3 1 M roztworu Na_2CO_3 . Po wymieszaniu próbkę lekko ogrzać i ustrząsając kroplami dodawać 0,01 M roztwór KMnO_4 , aż do utrzymującego się około 2 minut różowego zabarwienia.

ZASADA: Pod wpływem KMnO_4 dochodzi do rozzerwania podwójnego wiązania z równoczesnym utlenieniem sąsiednich atomów węgla. Kwas rozpada się na dwa lub więcej fragmenty.

B

WYKONANIE: Do dwóch próbek odmierzyć po 2 cm^3 1% roztworu masła i oleju lnianego w CCl_4 . Następnie dodajemy z biurety 0,5% roztwór bromu w czterochloroku węgla aż do otrzymania trwałego brązowego zabarwienia. Porównujemy ilość cm^3 roztworu, bromu zużytych do każdej próby.

Zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych określa się za pomocą **LICZBY JODOWEJ**. Jest to ilość gramów jodu, która wiąże 100 g badanego tłuszczu.

Przy badaniu tym wykorzystuje się zdolność podwójnego wiązania, obecnego w nienasyconych kwasach tłuszczowych, do przyłączenia dwóch atomów chlorowca. Naczęściej do oznaczania liczby jodowej używa się BROMU, gdyż reakcja z JODEM przebiega bardzo wolno.



45

PRÓBA NA JELCZENIE ALDEHYDOWE

WYKONANIE: Do cylinderka z doszlifowanym korkiem wlewamy 2 cm^3 szklanego oleju, 2 cm^3 stężonego HCl i mocno ustrząsamy przez 1 minutę. Następnie dodajemy 2 cm^3 0,15% roztworu rezorcyny w benzynie, wylrzę-

LIPIDY - ĆWICZENIA

samy i pozostawiamy do czasu rozdzielenia się warstw. Czerwone zabarwienie warstwy kwasowej wskazuje na jełczenie aldehydowe.

ZASADA: Proces psucia się tłuszczów nazywamy jełczeniem. Zjawisko to polega na rozpadzie tłuszczów na glicerynę i kwasy tłuszczowe oraz ich dalszą przemianę pod wpływem tlenu atmosferycznego, światła słonecznego, ciepła, wilgoci oraz bakterii i pleśni. Tłuszcz jełczący posiada niemiłą woń i przykry smak. Oleje psują się szybciej pod wpływem tlenu atmosferycznego, gdyż atomy tlenu przyłączają się do podwójnych wiązań. Powstałe tą drogą nadtlénki ulegają rozkładowi do aldehydów.



46

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI LIPAZY TRZUSTKOWEJ

Tłuszcze spożyte w pokarmach rozkładane są przez **LIPAZĘ TRZUSTKOWĄ**. Miara aktywności tego enzymu jest ilość kwasów tłuszczowych odszczepionych podczas inkubacji trójglicerydów z enzymem. Warunkiem zabezpieczającym efektywne działanie enzymu jest obecność żółci. Zawarte w żółci kwasy żółciowe działają emulgująco na tłuszcz, rozbijają go na małe kuleczki i tym samym zwiększają powierzchnię zetknięcia enzymu z substratem. Upośledzenie trawienia tłuszczów może być spowodowane niedostateczną zawartością lipazy w soku trzustkowym lub brakiem (niedoborem) kwasów żółciowych. W stanach zapalnych trzustki na skutek aktywacji enzymów proteolitycznych, zawarte w soku trzustkowym składniki ulegają resorpcji do krwi, wówczas może dochodzić do zwiększenia aktywności lipazy w surowicy. Lipaza trzustkowa jest enzymem bardzo nietrwałym i dlatego w celu wykazania jej działania należy posługiwać się świeżym preparatem trzustki.

Odszczepione pod wpływem lipazy kwasy tłuszczowe zmieniają odczyn środowiska na lekko kwaśny, ich ilość oznacza się przez miareczkowanie ługiem.

ODCZYNNIKI - OLIWA

- ŻOŁĆ rozcieńczona 100 razy
- 0,05 M BUFOR FOSFORANOWY o pH = 7,0
- SOK TRZUSTKOWY - przygotowany ze świeżej trzustki
- 0,1 N NaOH
- 1% ALKOHOLOWY ROZTWÓR FENOLOFTALEINY

LIPIDY - ĆWICZENIA

WYKONANIE OZNACZENIA:

Kolejność wykonywanych czynności i dodawanych odczynników zestawiona jest w tablicy:

ODCZYNNIKI	M- PROBOWKI		
	1	2	3 PROBA ODCZYNNIKOWA
OLIWA	0,5 cm ³	0,5 cm ³	0,5 cm ³
ROZCIERCZONA ŻOŁC	5,0 cm ³	-	5,0 cm ³
0,05 M BUFOR FOSFORANOWY	5,0 cm ³	5,0 cm ³	5,0 cm ³
H ₂ O	-	5,0 cm ³	-
wymieszać próbówki przez energiczne wstrząsanie			
SWIEŻY SOK TRZUSTKOWY	2,0 cm ³	2,0 cm ³	-
ZAGOTOWANY SOK TRZUSTKOWY	-	-	2,0 cm ³

Po dodaniu wszystkich odczynników zawartość próbek dokładnie wymieszać i inkubować przez 20 minut w temp. 40°C mieszając co pewien czas.

Po inkubacji zawartość próbek przełożyć do kolbek Erlenmayera, popłukując je 3 razy wodą. Popłuczyny ślać do kolbek. Zagotować próbówki zawierające aktywny enzym (próbki 1 i 2). Zawartość każdej kolbki miareczkować 0,1 N NaOH, używając jako wskaźnika fenoloftaleiny. Podczas miareczkowania zawartość kolbek energicznie mieszać, zwłaszcza pod koniec miareczkowania.

WYKONANIE OBLICZEŃ:

Wyniki miareczkowania przedstawić jako ilość miligramorównoważników (millekwivalentów) kw. tłuszczowych odszczepionych przez 100 cm³ soku trzuskowego.

LIPIDY - ĆWICZENIA

$$1000 \text{ cm}^3 0,1 \text{ N NaOH} = 1000 \text{ cm}^3 0,1 \text{ N kw. tłuszcz.} = \frac{1000}{10} \text{ mEq}$$

$$A \text{ cm}^3 0,1 \text{ N NaOH} \quad \text{odpowiada} \quad x \text{ mEq}$$

$$A = \text{cm}^3 \text{ próbki badanej} - \text{cm}^3 \text{ próby ślepej}$$

$$x \text{ mEq} = \frac{A \times 1000}{10 \times 1000} = \frac{A}{10} \text{ mEq dla badanej objętości soku}$$

$$2 \text{ cm}^3 \text{ soku trzustkowego} \quad \frac{A}{10} \text{ mEq}$$

$$100 \text{ cm}^3 \text{ soku trzustkowego} \quad x$$

$$x = \frac{100 \times A}{10 \times 2} \text{ mEq kwasów tłuszczowych odszczepionych przez } 100 \text{ cm}^3 \text{ soku trzustkowego}$$

$$x = 5 \times A \text{ mEq}$$

47 REAKCJA LIEBERMANA - BURCHARDA NA CHOLESTEROL

WYKONANIE: Do suchej próbówki wlewamy 1 cm^3 roztworu cholesterolu w chloroformie. dodajemy około 5 kropli bezwodnika octowego i wlewamy ostrożnie po ściankach próbówki - 2 krople stężonego H_2SO_4 . Roztwór w próbówce staje się kolejno czerwony, fioletowy, niebieski, ciemnozielony. Obecność wody przeszkadza w sąsiedzi reakcji.

LIPIDY - ĆWICZENIA



48

OOCZYW CARR-PRICEA. WYKRYWANIE WITAMINY A

WYKONANIE: Do probówki odmierzyć $0,5 \text{ cm}^3$ chloroformowego roztworu witaminy A. Do probówki dodać kilka kropli nasyconego roztworu trojchorku antymonu w chloroformie. W obecności witaminy A występuje niebieskie zabarwienie.

Opisana reakcja pozwala na kolorymetryczne oznaczanie karotenoidów.



49

WYKRYWANIE WITAMINY D

WYKONANIE: Na suche szkiełko zegarkowe nanieść 1 kroplę witaminy D i 2 krople roztworu bromu w chloroformie (1:50). Krople dobrze zmeszać ze sobą. Po pewnym czasie pojawia się niebieskawe zabarwienie.

SPIS TRESCI

	STR.
1. WIADOMOSCI WSTEPNE	1
1.1. JONIZACJA WODY	1
1.2. DEFINICJA KWASU I ZASADY	2
1.3. DEFINICJA pH I pK	2
1.4. ROWNANIE HENDERSONA-HASSELBACHA	3
1.5. POJEMNOSC BUFOROWA	3
2. AMINOKWASY	4
2.1. PUNKT IZOELEKTRYCZNY	5
2.2. KRZYWE MIARECZKOWANIA	6
2.3. PODZIAŁ AMINOKWASOW	8
2.3.1. AMINOKWASY Z APOLARNYM ŁANCUCHEM BOCZNYM [R] HYDROFOBOWE	8
2.3.2. AMINOKWASY Z POLARNYMI GRUPAMI [R] NIE WYKAZUJACYMI ŁADUNKU	9
2.3.3. AMINOKWASY NAŁADOWANE UJEMNIE	10
2.3.4. AMINOKWASY NAŁADOWANE DODATNIO (ZASADOWE)	11
2.3.5. AMINOKWASY RZADKO WYSTĘPUJĄCE W BIAŁKACH	11
2.3.6. AMINOKWASY NIEBIAŁKOWE	12
2.3.7. AMINOKWASY NATURALNE NIE WYSTĘPUJĄCE W BIAŁKACH	13
2.4. WŁASNOŚCI AMINOKWASOW	14
2.4.1. WIDMA ABSORPCYJNE AMINOKWASOW	14
2.4.2. REAKCJE CHEMICZNE AMINOKWASOW	15
1. REAKCJA GRUPY KARBOKSYLOWEJ	15
2. REAKCJE GRUPY α-AMINOWEJ	15
A/ REAKCJA Z 1-FLUORO-2,4-DINITROBENZENEM	16
B/ REAKCJA Z CHLORKIEM DANYLU	16
C/ REAKCJA EDMANA	17
D/ ZASADY SCHIFFA	17
[1] REAKCJA NINHYDRYNOWA	18
[2] REAKCJA van SLYKE'A Z KWASEM AZOTAWYM	19
[3] REAKCJA ADAMKIEWICZA - HOPKINSA NA TRYPTOFAN	19
[4] ODCZYN MILLONA	20
[5] WYKRYWANIE AMINOKWASOW SIARKOWYCH	20
[6] REAKCJA PAULY'EGO NA HISTYDYNIE	20

7	REAKCJA SAKAGUCHIEGO NA ARGININĘ	21
8	OZNACZANIE AZOTU GRUP AMINOWYCH METODĄ FORMOŁOWEGO MIARECZKOWANIA - METODA SORENSENA	21
3.	PEPTYDY	24
3.1.	BUDOWA PEPTYDÓW	24
3.2.	HORMONY PEPTYDOWE	27
3.3.	NEUROPEPTYDY	30
3.4.	ANTYBIOTYKI PEPTYDOWE	31
4.	BIAŁKA	32
4.1.	STRUKTURA BIAŁEK	32
4.2.	KLASYFIKACJA BIAŁEK I WYSTĘPOWANIE W PRZYRODZIE	36
4.2.1.	SFEROPROTEINY	37
	1. ALBUMINY	37
	2. GLOBULINY	38
	3. HISTONY	39
	4. PROLAMINY	40
	5. PROTAMINY	41
	6. GLUTELINY	41
4.2.2.	SKLEROPROTEINY	41
4.3.	BIAŁKA ZŁOŻONE	42
4.3.1.	FOSFOPROTEINY	42
4.3.2.	CHROMOPROTEINY	43
4.3.3.	LIPOPROTEINY	43
4.3.4.	GLIKOPROTEINY	46
4.3.5.	NUKLEOPROTEINY	46
4.3.6.	METALOPROTEINY	47
4.4.	CHARAKTERYSTYKA FIZYKOCHEMICZNA BIAŁEK	47
4.4.1.	CHARAKTER AMFOTERYCZNY	47
4.4.2.	ROZPUSTCZALNOŚĆ	48
4.4.3.	WYSALANIE	50
4.4.4.	DENATURACJA	51
4.4.5.	NASA CZĄSTECZKOWA	51
4.4.6.	BIAŁKA OSOCZA	52
9	WYSALANIE BIAŁEK	60
10	OZNACZANIE PUNKTU IZOELEKTRYCZNEGO KAZEINY	61
11	ODDZIELANIE ALBUMIN OD GLOBULIN SIARCZANEM AMONU	62

* [12]	ODDZIELANIE ALBUMIN OD GLOBULIN SIARCZANEM MAGNEZU I SIARCZANEM AMONU	63
[13]	DENATURACJA BIAŁKA	63
[14]	REAKCJA BIURETOWA PIOTROWSKIEGO	63
[15]	OZNACZANIE STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ BIURETOWĄ PRZYGOTOWANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ	64 65
	OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA O NIEZNANYM STĘŻENIU	65
[16]	OZNACZANIE STĘŻENIA BIAŁKA METODĄ LOWRY'EGO KRZYWA WZORCOWA	65 66
	OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA O NIEZNANYM STĘŻENIU	67
5.	CHROMATOGRAFIA	68
5.1.	CHROMATOGRAFIA ADSORPCYJNA	68
	[17] WYZNACZANIE IZOTERM ADSORPCJI ALBUMINY I KAZEINY NA FOSFORANIE TRÓJWAPNIOWYM	69
5.2.	CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA	70
	[18] WYMIANA JONÓW W PROCESIE KOLUMNOWYM	71
5.3.	CHROMATOGRAFIA PODZIAŁOWA	72
5.3.1.	CHROMATOGRAFIA PODZIAŁOWA KOLUMNOWA	73
5.3.2.	CHROMATOGRAFIA PODZIAŁOWA BIBUŁOWA	73
	[19] CHROMATOGRAFIA BIBUŁOWA - KRAŻKOWA AMINOKWASÓW	75
5.4.	CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA	76
	[20] CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA NA PŁYTKACH POKRY- TYCH KISELGELEM	76
5.5.	CHROMATOGRAFIA MOLEKULARNO-SITOWA (SĄCZENIE MOLEKULAR- NE	77
5.5.1.	DIALIZA	77
5.5.2.	SĄCZENIE NA ŻELACH SEPHADEX	78
5.6.	CHROMATOGRAFIA POWINOWACTWA	78
6.	ELEKTROFOREZA	79
6.1.	NISKONAPIĘCIOWA ELEKTROFOREZA BIBUŁOWA	80
6.2.	NISKONAPIĘCIOWA ELEKTROFOREZA ŻELOWA	81
6.3.	WYSOKONAPIĘCIOWA ELEKTROFOREZA BIBUŁOWA	82
6.4.	IMUNOELEKTROFORZA	82
7.	ENZYMY	83
7.1.	CHARAKTERYSTYKA CENTRUM KATALITYCZNEGO	83
7.1.1.	WIĄZANIA ELEKTROSTATYCZNE	84
7.1.2.	WIĄZANIA WODOROWE	85

7.1.3.	SILY van der WAALSA	87
7.2.	BUDOWA ENZYMOW	87
7.3.	PREENZYM	88
7.4.	HETEROENZYM	88
7.5.	IZOENZYM	90
7.6.	JEDNOSTKA AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ	90
7.7.	SZYBKOSC REAKCJI ENZYMATYCZNEJ	91
7.7.1.	KINETYKA REAKCJI CHEMICZNYCH	91
7.7.2.	WPŁYW STEŻENIA SUBSTRATU	94
7.7.3.	WPŁYW STEŻENIA ENZYMU	98
7.7.4.	WPŁYW NADMIARU PRODUKTÓW LUB SUBSTRATÓW	98
7.7.5.	WPŁYW TEMPERATURY	99
7.7.6.	WPŁYW pH	100
7.7.7.	WPŁYW AKTYWATORÓW	100
7.7.8.	WPŁYW INHIBITORÓW	101
	A/ INHIBICJA KOMPETYCYJNA	102
	B/ INHIBICJA NIEKOMPETYCYJNA	104
	C/ INHIBICJA NIEODWRACALNA	106
	D/ INHIBICJA ALLOSTERYCZNA	107
7.8.	LOKALIZACJA ENZYMÓW W ORGANELLACH KOMÓRKOWYCH	107
7.9.	ENZYMY SUROWICY KRWI	109
7.9.1.	ENZYMY SEKRECyjne	109
7.9.2.	ENZYMY WSKAZNIKOWE	109
7.9.3.	ENZYMY EKSKRECYJNE	110
7.9.4.	PRAWIDŁOWE WARTOŚCI AKTYWNOŚCI NIEKTÓRYCH ENZYMÓW OSOCZA KRWI	111
7.9.5.	ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE POSZCZEGÓLNYCH ENZYMÓW	119
	A/ CHOROBY WĄTROBY	119
	B/ CHOROBY SERCA	120
	C/ CHOROBY TRZUSTKI	121
	D/ NOWOTWORY	121
	E/ CHOROBY KRWI	121
	F/ CHOROBY MIĘSNI SZKIELETOWYCH	121
	G/ ENZYMY W TOKSYKOLOGI	122

1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI HYDROLAZ	122
1.1. α-AMYLAZA	122
[21] OZNACZANIE AKTYWNOŚCI α -AMYLAZY W OSOCZU METODĄ WOLGHEMUTHA	123
[22] OZNACZANIE AKTYWNOŚCI α -AMYLAZY METODĄ WINSLOWA	124
1.2. CHOLINOESTERAZY	125
INHIBITORY ESTERAZ CHOLINOWYCH	126
[23] OKREŚLANIE AKTYWNOŚCI PSEUDOCOLINOESTERAZY METODĄ TESTU BIBULOWEGO	127
1.3. FOSFATAZY	128
[24] OZNACZANIE AKTYWNOŚCI FOSFATAZY ZASADOWEJ METODĄ BESSEY-LOWRY'EGO	128
2. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI OKSYDAZ	130
2.1. CERULOPLAZMINA	130
INHIBITORY CERULOPLAZMINY	131
[25] OZNACZANIE AKTYWNOŚCI CERULOPLAZMINY W SUROWICY METODĄ RAVINA	132
2.2. OKSYDAZA GLUKOZOWA	133
[26] OZNACZANIE STĘŻENIA GLUKOZY WE KRWI TESTEM BIBULOWYM DEXTROSTIX	133
3. BADANIE KINETYKI REAKCJI ENZYMATYCZNYCH	134
[27] IZOLOWANIE INWERTAZY	134
[28] OKREŚLANIE WPŁYWU SUBSTRATU NA SZYBKOŚĆ REAKCJI KATALIZOWANEJ PRZEZ INWERTAZĘ	134
[29] WYZNACZANIE KRZYWEJ MICHAELISA	136
7.10. KLASYFIKACJA SYSTEMOWA ENZYMÓW	140
7.11. KOENZYMY I ODPOWIEDNIE WITAMINY	149
8. KOENZYMY	150
8.1. KOENZYMY OKSYDOREDUKTAZ	150
8.2. KOENZYMY TRANSFERAZ	156
8.2.1. KOENZYMY PRZENOSZĄCE FRAGMENTY C_1	162
8.2.2. KOENZYMY PRZENOSZĄCE FRAGMENTY C_2 I WIĘCEJ	166
9. KWASY NUKLEINOWE	168
[30] IZOLOWANIE RNA Z DROZDZY	172
[31] ILOŚCIOWE OZNACZANIE RNA DROZDZY NA PODSTAWIE ZAWARTOŚCI RYBOZY	173

[32]	ODRÓŻNIANIE RNA OD DNA	174
	REAKCJA Z ORCYNĄ	174
	REAKCJA Z DIFENYLOAMINĄ	174
	REAKCJA FEUELGENA NA DEOKSYRYBOZĘ	175
[33]	HYDROLIZA KWAŚNA KWAŚÓW NUKLEINOWYCH	175
[34]	WYKRYWANIE PENTOZY	175
[35]	WYKRYWANIE KWAŚU FOSFOROWEGO	176
[36]	WYKRYWANIE ZASAD AZOTOWYCH (PURYN)	176

10.	LIPIDY	177
10.1.	TŁUSZCZE PROSTE	177
10.1.1.	TŁUSZCZE WŁAŚCIWE	177
10.1.2.	WOSKI	181
10.2.	TŁUSZCZE ZŁOŻONE	182
10.2.1.	FOSFOGLICERYDY	182
10.2.2.	SFINGOLIPIDY	185
10.3.	STERYDY, KAROTENOWCE I WITAMINY ROZPUZZCZALNE W TŁUSZCZACH	186
10.4.	REAKCJE CHARAKTERYSTYCZNE	190
[37]	ROZPUZZCZALNOŚĆ TŁUSZCZÓW	190
[38]	OTRZYMYWANIE AKROLEINY	190
[39]	OTRZYMYWANIE MYDŁA	191
[40]	WYSALANIE MYDŁA	191
[41]	OTRZYMYWANIE MYDŁA NIEROZPUZZCZALNEGO	192
[42]	OTRZYMYWANIE EMULSJI TŁUSZCZU	192
[43]	WYDZIELANIE WOLNYCH KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH	192
[44]	WYKAZANIE OBECNOŚCI NIENASYCONYCH KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH	193
[45]	PROBA NA JEŁCZENIE ALDEHYDOWE	193
[46]	OZNACZANIE AKTYWNOŚCI LIPAZY TRZUSTKOWEJ	194
[47]	REAKCJA LIBERMANA - BURCHARDA NA CHOLESTEROL	196
[48]	ODCZYN CARR-PRICEA. WYKRYWANIE WITAMINY A	197
[49]	WYKRYWANIE WITAMINY D	197

11.	WĘGLOWODANY	198
11.1.	MONOSACHARYDY	198
11.1.1.	POCHODNE MONOSACHARYDÓW	201



