

AKADEMIA MEDYCZNA
W BIAŁYMSTOKU

ĆWICZENIA Z BIOCHEMII

dla studentów Wydziału Farmaceutycznego

Pod redakcją:
Krzysztofa Zwierza

WYDAWNICTWO UCZELNIANE

BIAŁYSTOK

1994

Cryt

3054/2

Akademia Medyczna
w Białymstoku

ĆWICZENIA Z BIOCHEMII

dla studentów Wydziału Farmaceutycznego

Pod redakcją:
Krzysztofa Zwierza

Opracowali:
Leszek P. Arciuch, Zbigniew Koniusz, Katarzyna Rostkowska,
Krzysztof Zwierz

Oficina Wydawnicza Akademii Medycznej w Białymstoku

Białystok 1994

Recenzenci:
Prof.dr hab. Sławomir Strumiło,
Prof.dr hab. Krzysztof Worowski

Redaktor techniczny:
Leszek P. Arciuch

Opracowanie graficzne:
Leszek P. Arciuch, Krzysztof Zwierz, Nina Żdanuk



365/11

Oficyna Wydawnicza Akademii Medycznej w Białymstoku

Zam. 21/94, nakład 150 egz. f. A-4

Alic. 72/3-94d

Przedmowa

Zasadniczym celem opracowania skryptu była chęć przyjscia z pomocą studentom Wydziału Farmaceutycznego AM w Białymstoku w zrozumieniu istoty doświadczeń wykonywanych na ćwiczeniach z biochemii. Skrypt zawiera ćwiczenia opracowane na podstawie literatury oraz doświadczeń asystentów i techników Zakładu Biochemii Farmaceutycznej AM w Białymstoku.

Pragnę podziękować współautorom skryptu: mgr. Leszkowi Arciuchowi, lek.med. Zbigniewowi Koniuszowi i mgr Katarzynie Rostkowskiej za pomoc w opracowaniu części ćwiczeń, plastycze Instytutu Chemii AMB Ninie Żdanuk za współudział w opracowaniu rycin i schematów oraz st.tech.med. Elżbiecie Lipczyńskiej i st.tech.med. Jolancie Zawadzkiej za cenne uwagi techniczne dotyczące poszczególnych ćwiczeń.

Na zakończenie przypadł mi miły obowiązek podziękowania recenzentom, prof.dr hab. Sławomirowi Strumiło i prof.dr hab. Krzysztofowi Worowskiemu, którzy bardzo wnikliwie przeanalizowali tekst i zaproponowali cenne zmiany.

Zdaję sobie sprawę z tego, iż mimo wysiłków autorów i recenzentów skrypt nie jest doskonały i można poprawić jego treść i formę. Przeto zwracam się do czytelników z uprzejmą prośbą o zgłaszanie uwag i propozycji dotyczących ćwiczeń z biochemii i niniejszego skryptu asystentom i kierownikowi Zakładu Biochemii Farmaceutycznej AMB.

Prof.dr hab. Krzysztof Zwierz

Spis treści

Regulamin pracowni	7
Ćwiczenie 1	
Otrzymywanie frakcji podkomórkowych (<i>Krzysztof Zwierz</i>)	9
Ćwiczenie 2	
Enzymy lizosomalne (<i>Krzysztof Zwierz</i>)	14
Ćwiczenie 3	
Ogólne właściwości N-acetylo- β -heksozoaminidazy (<i>Krzysztof Zwierz</i>)	26
Ćwiczenie 4	
Wyznaczanie szybkości maksymalnej (V_{max}) reakcji enzymatycznej i stałej Michaelisa (K_M) N-acetylo- β -heksozoaminidazy (<i>Krzysztof Zwierz</i>)	39
Ćwiczenie 5	
Izoenzymy N-acetylo- β -heksozoaminidazy (<i>Krzysztof Zwierz</i>)	50
Ćwiczenie 6	
Transaminacja katalizowana przez aminotransferazę alaninową (AIAT) (<i>Leszek P. Arciuch, Krzysztof Zwierz</i>)	57
Ćwiczenie 7	
Białka komórkowe i białka osocza krwi. Elektroforeza białek frakcji cytoplazmatyczno-mikrosomalnej i białek osocza w żelu poliakrylamidowym (<i>Katarzyna Rostkowska, Krzysztof Zwierz</i>)	62
Ćwiczenie 8	
Otrzymywanie kwasów nukleinowych z leukocytów (<i>Zbigniew Koniusz</i>)	73
Ćwiczenie 9	
Elektroforeza DNA w żelu agarozowym (<i>Leszek P. Arciuch, Zbigniew Koniusz</i>)	78
Ćwiczenie 10	
Oznaczenie składników cukrowych glikoprotein przy użyciu dwukierunkowej immunoelektroforezy w żelu agarozowym z zastosowaniem lektyn (<i>Leszek P. Arciuch, Katarzyna Rostkowska</i>)	83
Tematy seminariów do ćwiczeń 1-15 (<i>Krzysztof Zwierz</i>)	91
Podręczniki	95

Regulamin pracowni

1. Do ćwiczeń praktycznych z biochemii będzie dopuszczony tylko ten student, który zna cel ćwiczenia, wie co będzie robił i potrafi uzasadnić celowość zaproponowanego przez siebie postępowania.
2. Student powinien znać materiał seminaryjny bieżącego ćwiczenia i poprzednich ćwiczeń.
3. Przed wejściem do pracowni należy nałożyć fartuch ochronny i miękkie obuwie. Do pracowni zabrać jedynie rzeczy niezbędne, jak instrukcję do ćwiczeń i materiały piśmienne.
4. W pracowni należy unikać zbędnych rozmów, nie wolno spożywać pokarmów i napojów.
5. Palenie papierosów jest dozwolone wyłącznie w miejscach do tego wyznaczonych.
6. Przed przystąpieniem do ćwiczeń student powinien być poinformowany, gdzie znajdują się 5% NaHCO_3 i 1% kwas octowy, służące do neutralizacji mocnych kwasów i zasad.
7. Wykonując doświadczenia należy oszczędnie użytkować odczynniki chemiczne. Do doświadczeń brać możliwie mało substancji i odczynników (najlepiej tyle ile jest podane w instrukcji do wykonywanego doświadczenia lub w/g wskazówek osoby prowadzącej ćwiczenia). Nie wolno zlewać odczynników z powrotem do butelek, ani też zamieniać korków i pipet.
8. Należy dbać o czystość miejsca pracy. Na stole i na półkach z odczynnikiem powinien panować porządek. Rozlane kwasy natychmiast zneutralizować 5% NaHCO_3 , a zasady 1% kwasem octowym, a następnie umyć wodą.
9. Wszelkie odpadki stałe (papier, szkło) należy wrzucać do kamionek, natomiast stężone kwasy i zasady wylewać do zlewu na bieżącą wodę.
10. Wszelkie prace z substancjami łatwopalnymi, lotnymi oraz stężonymi kwasami i zasadami należy wykonywać pod wyciągiem i z zachowaniem szczególnych środków ostrożności. Stężonych kwasów i zasad, trucizn oraz roztworów lotnych nie wolno aspirować ustami. Zużyte odczynniki wylewać do zlewu w taki sposób, aby uniknąć poparzenia przez odbite od ścianek zlewu krople płynu. Natychmiast spłukiwać zlew bieżącą wodą. Płynami łatwopalnymi posługiwać się gdy palniki gazowe są zgaszone i nie ma innych źródeł otwartego ognia. Po użyciu płynów naczynia szczelnie zamykać.
11. W przypadku poparzenia lub skaleczenia (zwłaszcza w oparzeniach oczu) natychmiast zgłosić osobie prowadzącej ćwiczenia. W przypadku poparzenia płynami żrącymi (stężone kwasy lub zasady) natychmiast obficie zmyć oblaną powierzchnię ciała wodą wodociągową i zgłosić osobie prowadzącej ćwiczenia. Następnie zobojętnić: kwasy 5% NaHCO_3 , a zasady 1% kwasem octowym.
12. Należy umiejętnie korzystać z instalacji gazowej. Przy zapalaniu palnika gazowego należy najpierw zamknąć dopływ powietrza, następnie zbliżyć zapaloną zapalniczkę do wylotu kominka i powoli otworzyć kurek gazowy. Następnie uregulować dopływ powietrza (płomień nie powinien huczeć i kopcić). Niepotrzebny palnik należy natychmiast zgasić.

13. W razie zapalenia się mieszaniny reakcyjnej, stołu lub fartucha ochronnego natychmiast zawiadomić osobę prowadzącą ćwiczenia i gasić przykrywając ogień kocem gaśniczym (koc wisi na ścianie w sali ćwiczeniowej). Studenci z długimi włosami muszą je zabezpieczyć czepkiem ochronnym.
14. **Po ukończeniu ćwiczenia każdy student powinien uporządkować swoje stanowisko pracy, umyć szkło laboratoryjne oraz umieścić butelki z odczynnikami i pojemniki z substancjami na właściwym miejscu, sprawdzić czy zamknięte są kurki gazowe i zakręcone krany wodne i zameldować o wykonaniu zadania osobie dyżurnej.** Dyżurny melduje o uporządkowaniu stanowisk pracy swojej grupy osobie prowadzącej ćwiczenia.

Ćwiczenie 1

Temat: Otrzymywanie frakcji podkomórkowych

Podstawy teoretyczne

1. Budowa komórki zwierzęcej.
2. Organella komórkowe - ich identyfikacja enzymatyczna i mikroskopowa.
3. Zasady izolowania enzymów.

Literatura

1. Harper H.A. i wsp., (1983): Zarys chemii fizjologicznej, PZWL, Warszawa, s. 77-78.
2. Witwicki J., Ardelt W. (red.), (1984): Elementy enzymologii, PWN, Warszawa, s. 225-272.
3. Ostrowski K., Kawiak J. (red.), (1985): Cytofizjologia. Podręcznik dla studentów medycyny, PZWL, Warszawa, s. 80-84.
4. Stryer L., (1986): Biochemia, PWN, Warszawa, s. 162-164, 254, 490-491, 767-774.

Cel ćwiczenia

1. Izolowanie frakcji lizosomalnej z homogenatu wątroby szczura metodą wirowania różnicowego.
2. Uwolnienie enzymów lizosomalnych, w tym N-acetylo- β -heksozoaminidazy.
3. Porównanie obrazów mikroskopowych różnych frakcji podkomórkowych wątroby szczura.

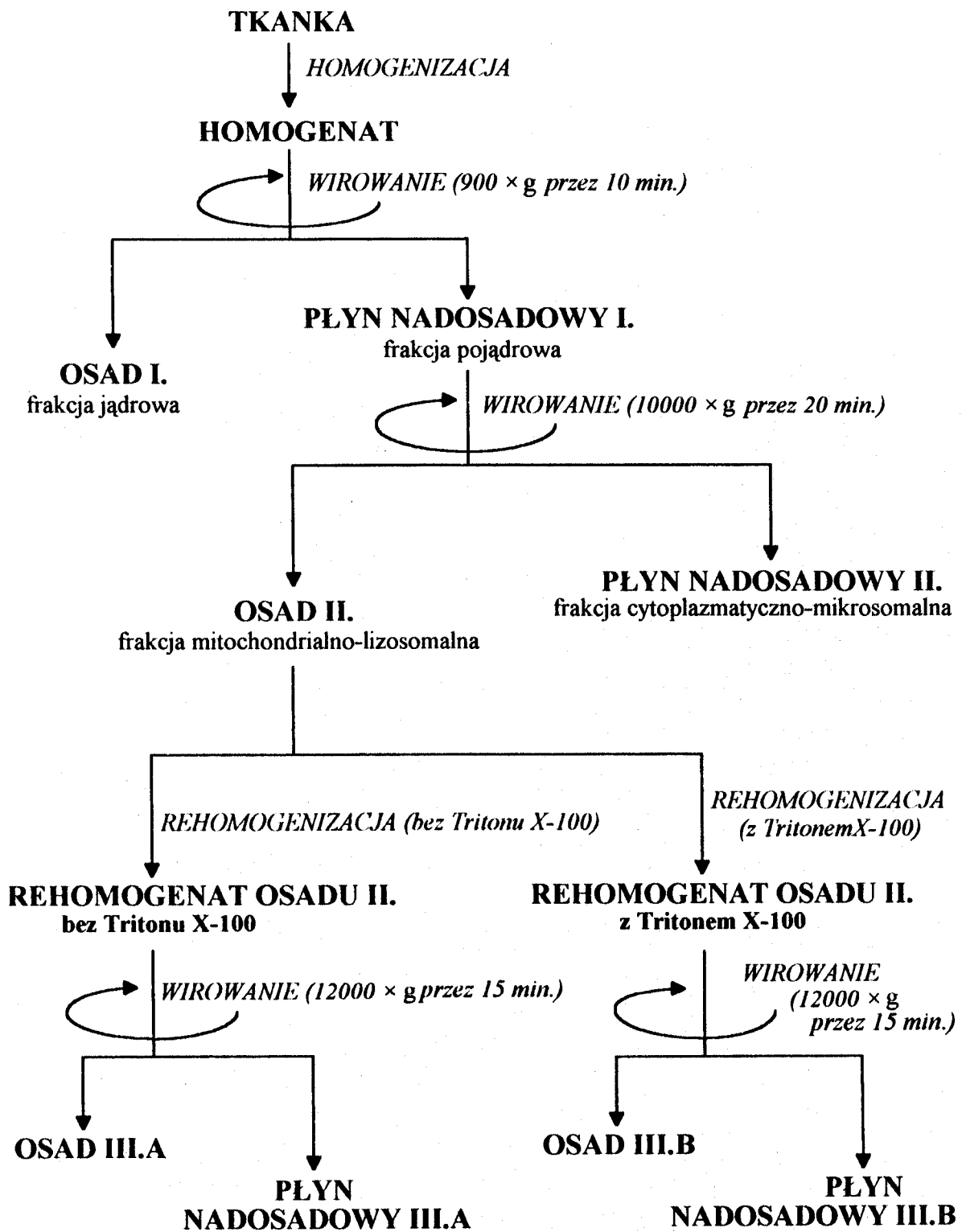
Odczynniki

- 1) 250 mM sacharoza (lodowato zimny roztwór),
- 2) 0,2% Triton X-100 w 250 mM roztworze sacharozy,
- 3) eter etylowy do narkozy.

Wykonanie

1. Pozyskanie tkanek

Szczura uśpić eterem. Wypreparować wątrobę i nerki i po perfuzji wątrobę zhomogenizować, a nerki zamrozić, oraz dalej postępować w/g schematu na ryc. 1..



Ryc. 1. Schemat otrzymywania N-acetylo-β-heksozoaminidazy frakcji lizosomalnej wątroby szczura.

2. Przygotowanie lizosomów

Z każdej frakcji, wyróżnionej wytłuszczonym drukiem, należy odebrać 1 ml (z frakcji osadu II - 0,1 ml) do oznaczenia aktywności enzymu i stężenia białka i zamrozić. Oznaczanie aktywności enzymatycznej i stężenia białka będzie wykonane podczas ćwiczenia 2.

W homogenizatorze szklanym z teflonowym tłokiem zhomogenizować 8 g uprzednio rozdrobnionej wątroby szczura w 72 ml lodowato zimnej 250 mM sacharozy. Zmierzyć objętość homogenatu, a 1 ml odebrać do oznaczeń i zamrozić. **Homogenat** odwirować przy $900 \times g$ przez 10 minut w temperaturze $0-4^{\circ}C$ (1000 obrotów, wirówka T-52). Zmierzyć objętość **osadu I** (frakcja zawierająca jądra, strzępki tkanki łącznej i częściowo rozbite komórki), odebrać 1 ml i zamrozić. Zmierzyć objętość **plynu I** nad osadem, odebrać 1 ml i resztę wirować przy $10.000 \times g$ przez 20 minut (12.000 obrotów, wirówka Unipan typ 310). Do dalszych doświadczeń zachować **osad II** (frakcja mitochondrialno-lizosomalna). Zmierzyć objętość **plynu II** nad osadem (frakcja cytoplazmatyczno-mikrosomalna), a następnie odebrać 1 ml i zamrozić. Otrzymany **osad II** zawiesić przez rehomogenizację w minimalnej ilości (ok. 0,8 ml) 250 mM lodowato zimnej sacharozy, zmierzyć objętość i odebrać 0,1 ml na oznaczenie aktywności enzymatycznej i białka.

3. Uwolnienie enzymów lizosomalnych

Zawiesinę frakcji mitochondrialno-lizosomalnej rozlać do dwóch plastikowych probówek o pojemności 1,5 ml. Oznakować je odpowiednio **A** i **B**. Zawartość probówki **A** rozcieńczyć przez rehomogenizację równą ilością 250 mM sacharozy. Natomiast zawartość probówki **B** rozcieńczyć równą objętością 250 mM sacharozy zawierającej 0,2% Tritonu X-100. Zawartość obu probówek dokładnie wymieszać i odstawić na 10 min. w temperaturze laboratoryjnej. Następnie obie zawiesiny odwirować przez 15 minut przy użyciu wirówki MPW 320.

4. Rozcieńczanie uwolnionych enzymów lizosomalnych

Osady A i B zawiesić przez rehomogenizację w takiej ilości 250 mM sacharozy jakiej użyto do uwalniania enzymów z lizosomów. Zamrozić **osady IIIA i IIIB** oraz **plyny nadosadowe IIIA i IIIB**.

5. Barwienie preparatów frakcji podkomórkowych hematoksyliną i eozyną

Na szkiełkach podstawowych wykonujemy rozmazy **homogenatu** wątroby szczura, **frakcji jądrowej** (osad po I wirowaniu), **frakcji mitochondrialno-lizosomalnej** (osad po II wirowaniu) i **frakcji cytoplazmatyczno-mikrosomalnej** (płyn nadosadowy po II wirowaniu).

5.1. Odczynniki:

Wszystkie znajdujące się na stole odczynniki są przygotowane do barwienia preparatów:

- 1) 70% etanol,

- 2) 95% etanol,
- 3) alkohol absolutny,
- 4) mieszanina alkoholu i ksylenu (1:1),
- 5) ksylen I,
- 6) ksylen II,
- 7) balsam kanadyjski (roztwór balsamu w miarę potrzeby rozcieńczyć ksylenem),
- 8) hematoksylina (W 1 l wody rozpuścić 1 g hematoksyliny. W tym roztworze rozpuścić 0,2 g jodanu sodu lub potasu i 50 g dobrze rozartego siarczanu glinowo-potasowego, dodać 50 g wodzianu chloralu i pozostawić do następnego dnia. Następnie dodać 1 g kwasu cytrynowego. Gotowy roztwór ma barwę czerwono-fioletową.),
- 9) eozyina (W 100 ml wody rozpuścić 0,25 g żółtej wodnej eozyiny, dodać 3 krople lodowatego kwasu octowego i 1 kryształek tymolu lub fenolu.).

5.2. Wykonanie:

5.2.1. Na szkiełko podstawowe nanieść kroplę badanego materiału, drugim szkiełkiem wykonać cienki rozmaz. Szkiełko z rozmazem pozostawiamy do wyschnięcia.

5.2.2. Wyschnięty rozmaz umieścić w kuwecie do barwienia i zalać roztworem hematoksyliny na 5 minut. Po tym czasie barwnik zlać i spłukać rozmazy wodą z kranu.

5.2.3. Wypłukane rozmazy zalać roztworem eozyiny na 3 minuty. Ponownie spłukać wodą z kranu.

5.2.4. Po wypłukaniu rozmazy utrwalić zalewając je kolejno:

- a) 70% etanolem przez 2 minuty,
- b) 95% etanolem przez 2 minuty,
- c) alkoholem absolutnym przez 2 minuty,
- d) mieszaniną alkoholu i ksylenu przez 3 minuty,
- e) ksylenem I przez 3 minuty,
- f) ksylenem II przez 3 minuty.

Po każdym etapie utrwalań preparatów roztwór należy zlać z powrotem do właściwego naczynia.

5.2.5. Na utrwalony preparat nakropić kroplę balsamu kanadyjskiego i przykryć szkiełkiem nakrywkowym.

5.2.6. Preparat oglądać pod mikroskopem przy powiększeniu $300\times$ używając kropli olejku imersyjnego.

6. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 2

Temat: Enzymy lizosomalne

Podstawy teoretyczne

1. Budowa i właściwości N-acetylo- β -heksozaminidazy.
2. Sposoby wyrażania aktywności enzymów.
3. Czynniki wpływające na aktywność enzymów.
4. Swoistość enzymów.
5. Metody oznaczania aktywności enzymów.
6. Sposoby kontroli i oceny poszczególnych etapów izolowania enzymów.

Literatura

1. Szczeklik E. (red.), (1967): Enzymologia kliniczna, PZWL, Warszawa, s. 155-164.
2. Witwicki J., Ardelt W. (red.), (1984): Elementy enzymologii, PWN, Warszawa, s. 38-61, 230-234.
3. Stryer L., (1986): Biochemia, PWN, Warszawa, s. 162-164, 254, 490-491, 767-774.
4. Zwierz K. i wsp., (1992): N-acetylo- β -heksozaminidaza - enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa., Postępy Biochemii, t.38, nr 3, s.127-132.
5. Ostrowska L. i wsp., (1993): Rola, właściwości i znaczenie kliniczne N-acetylo- β -heksozaminidazy., Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, t. 47, nr 1, s. 67-79.

Cel ćwiczenia

1. Oznaczenie aktywności specyficznej N-acetylo- β -heksozaminidazy w różnych frakcjach podkomórkowych.
2. Obliczenie stopnia oczyszczania enzymu i wydajności procesu.

Odczynniki

- 1) 200 mM bufor boranowy o pH 9,8;
- 2) bufor fosforanowo-cytrynianowy w/g Mc Ilvaine o pH 4,7;
- 3) p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozyd (substrat);
- 4) 0,25 mM p-nitrofenol;
- 5) 250 mM sacharoza;
- 6) odczynnik Folina i Ciocalteu;
- 7) odczynnik miedziowy;
- 8) 30 mg% albumina w roztworze sacharozy (wzorzec białka).

Wykonanie

1. Oznaczanie aktywności N-acetylo- β -heksozoaminidazy

1.1. Odczynniki (na stołach laboratoryjnych znajdują się odczynniki przygotowane do pracy):

1.1.1. 200 mM bufor boranowy o pH 9,8:

61 g $K_2B_4O_7 \times 4 H_2O$ rozpuścić w 800 ml wody dest. i doprowadzić do pH 9,8 pod kontrolą pehametru przy użyciu 200 mM KOH. Uzupełnić roztwór wodą dest. do objętości 1000 ml. Ponownie sprawdzić pH.

1.1.2. Bufor fosforanowo-cytrynianowy w/g Mc Ilvaine o pH 4,7:

2,5 g kwasu cytrynowego rozpuścić w 120 ml H_2O redest. Doprowadzić do pH 4,7 pod kontrolą pehametru 200 mM roztworem fosforanu sodu (Na_2HPO_4). Ponownie sprawdzić pH.

1.1.3. Substrat

138 mg p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu rozpuścić w 60 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7.

1.2. Oznaczenie aktywności enzymu:

Do 0,15 ml roztworu substratu dodać 0,2 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7 i 0,05 ml roztworu enzymu. Probówki z enzymem i substratem inkubować przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Reakcję przerwać przez dodanie 1 ml 200 mM buforu boranowego o pH 9,8. Ekstynkcję uwolnionego p-nitrofenolu zmierzyć przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 410 nm. Ilość uwolnionego p-nitrofenolu odczytać z wykresu kalibracyjnego, a odczytane wartości wpisać do tabeli III.

1.3. Wykres kalibracyjny p-nitrofenolu (pNP):

1.3.1. Sporządzenie wzorca:

7 mg p-nitrofenolu rozpuścić w 200 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7 (roztwór pNP jest 0,25 mM). (na stołach laboratoryjnych znajduje się odczynnik przygotowany do pracy).

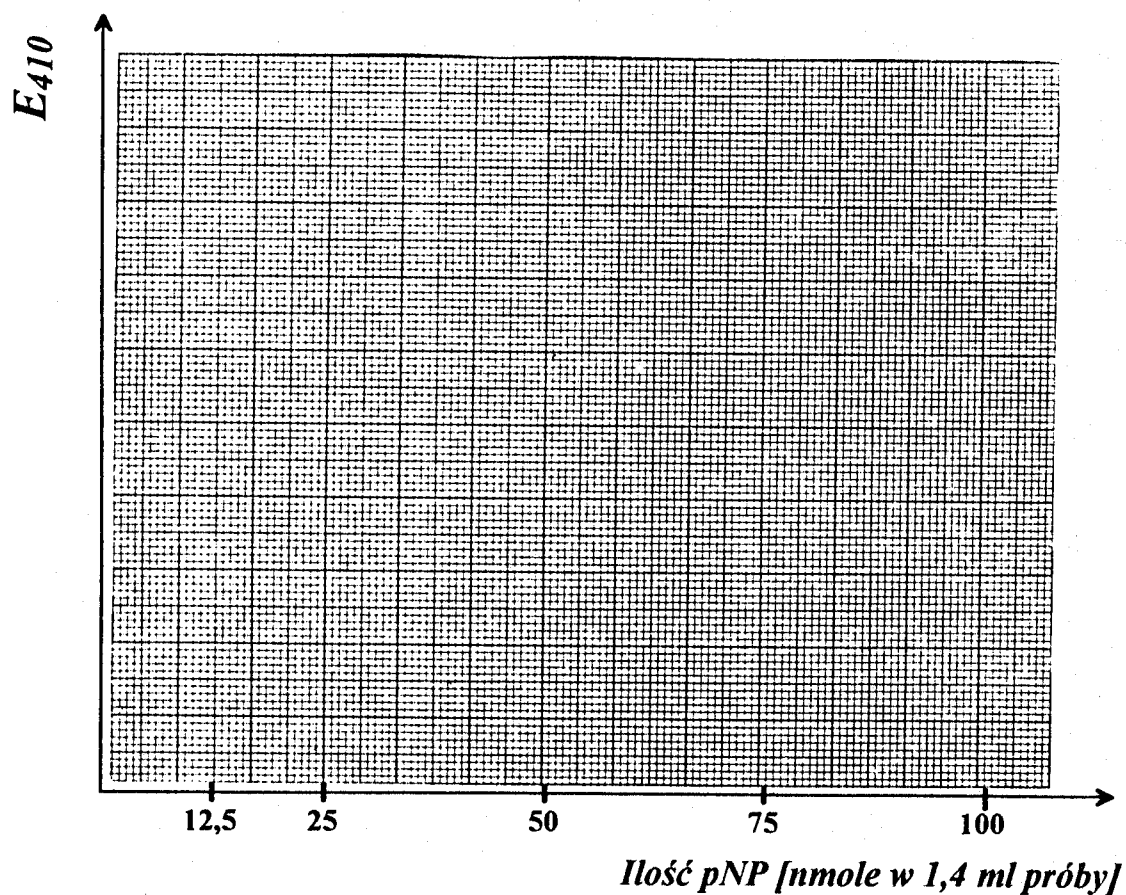
1.3.2. Wykonanie rozcieńczeń wzorca:

Wzorzec należy rozcieńczyć w/g tabeli I. i wpisać w odpowiedniej kolumnie wartości ekstynkcji (E_{410}) odczytane na spektrofotometrze:



Tabela I.

Nr próby	Objętość wzorca [ml]	Objętość 250 mM sacharozy [ml]	Objętość 200 mM buforu boranowego o pH 9,8 [ml]	Ilość nmoli p-nitrofenolu (pNP) w 1,4 ml próby	Wartość E_{410}
0	-	0,4	1,0	0	
1	0,05	0,35	1,0	12,5	
2	0,1	0,3	1,0	25	
3	0,2	0,2	1,0	50	
4	0,3	0,1	1,0	75	
5	0,4	-	1,0	100	



Ryc. 1. Wykres kalibracyjny pNP.

2. Oznaczanie białka metodą Lowry

2.1. Odczynniki (na stołach laboratoryjnych znajdują się odczynniki przygotowane do pracy):

2.1.1. Odczynnik Folina i Ciocalteau rozcieńczony wodą dest. w stosunku 1:2.

2.1.2. Odczynnik miedziowy:

1 ml 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ w 1% cytrynianie sodu rozcieńczyć 50 ml 2% Na_2CO_3 w 0,1 N NaOH.

2.2. Oznaczenie stężenia białka:

Do 0,4 ml próby dodać 2 ml odczynnika miedziowego sporządzonego bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia. Po 10 minutach do mieszaniny dodać stale mieszając na wytrząsarce 0,2 ml odczynnika Folina i Ciocalteau. Próby odstawić na 30 minut w temperaturze laboratoryjnej.

Ekstynkcję zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 750 nm. Stężenie białka odczytać z wykresu kalibracyjnego sporządzonego przy użyciu liofilizowanej albuminy wołowej, a wartości wpisać do tabeli III.

2.3. Wykres kalibracyjny albuminy wołowej:

2.3.1. Sporządzenie wzorca:

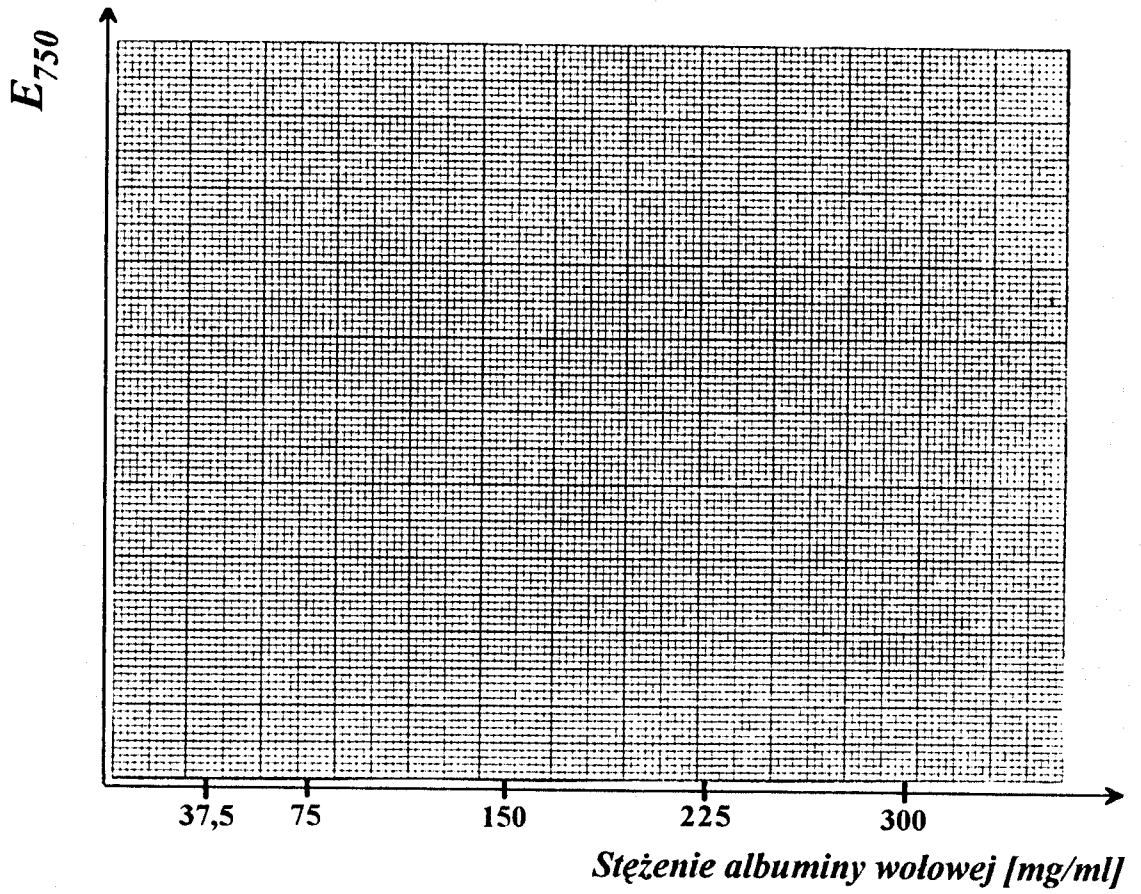
30 mg liofilizowanej albuminy wołowej rozpuścić w 100 ml 250 mM sacharozy (na stołach laboratoryjnych znajduje się odczynnik przygotowany do pracy).

2.3.2. Wykonanie rozcieńczeń wzorca:

Wzorzec należy rozcieńczyć w/g tabeli II. i wpisać w odpowiedniej kolumnie tej tabeli wartości ekstynkcji (E_{750}) odczytane na spektrofotetrze:

Tabela II.

Nr próby	Objętość roztworu albuminy wołowej [ml]	Objętość 250 mM sacharozy [ml]	Stężenie albuminy wołowej [mg/ml]	Wartość E_{750}
0	-	0,4	0	
1	0,05	0,35	37,5	
2	0,1	0,3	75,0	
3	0,2	0,2	150,0	
4	0,3	0,1	225,0	
5	0,4	-	300,0	



Ryc. 2. Wykres kalibracyjny albuminy wołowej.

3. Końcowe zestawienie wyników oznaczeń N-acetylo- β -heksozoaminidazy we frakcjach podkomórkowych:

Tabela III.

Frakcja	Białko				Enzym						
	Rozcień- czenie	E ₂₈₀ białka	Stężenie białka w rozcienzonej frakcji [mg/ml] (odczyt z wykresu kalibracyjnego albuminy)	Białko całkowite [mg/obj. frakcji]	Rozcień- czenie	E ₄₁₀ pNP	Odczyt z wykresu kalibracyj- nego pNP [*])	Aktywność całkowita [mKat/obj. frakcji]	Aktywność specyficzna [mKat/kg białka]	Stopień oczyszczenia	Wydajność [%]
Homogenat											
Osad I (f. jądrowa)											
Płyn nadosadowy I											
Osad II (f. mitochondrialno-lizosomalna)											
Płyn nadosadowy II (f. cytoplazmatyczno-mikrosomalna)											
Osad IIIA											
Osad IIIB (z Tritonem X-100)											
Płyn nadosadowy IIIA											
Płyn nadosadowy IIIB (z Tritonem X-100)											

*) Ilość nmoli pNP uwolnionego przez enzym zawarty w 50 μ l rozcieńczonej frakcji podkomórkowej w czasie 30 min. inkubacji.

4. Przykład obliczeń:

4.1. Całkowita aktywność enzymatyczna frakcji podkomórkowej

4.1.1. Sporządzanie wykresu kalibracyjnego p-nitrofenolu (pNP)

W 1000 ml 0,25 mM roztworu wzorca znajduje się 0,25 mmola pNP = 250 μ moli pNP,
w 1 ml = 1000 μ l 0,25 mM roztworu wzorca znajduje się 0,25 μ mola pNP = 250 nmoli pNP,
w 0,1 ml = 100 μ l 0,25 mM roztworu wzorca znajduje się 0,025 μ mola pNP = 25 nmoli pNP.

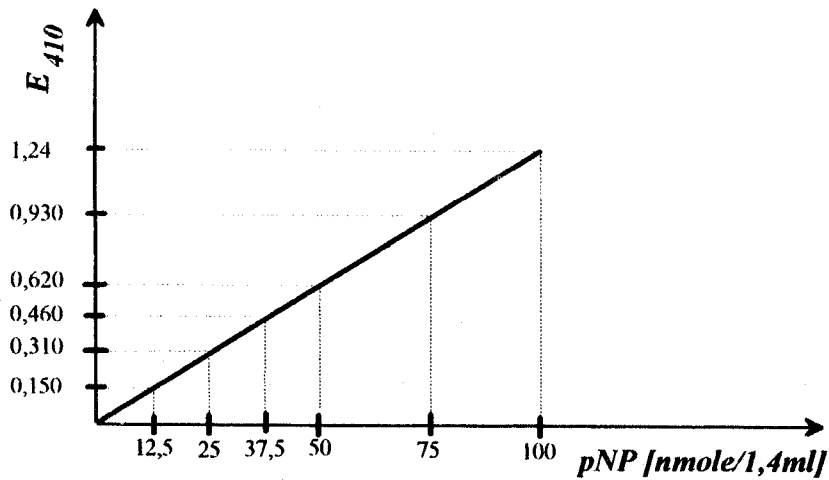
1,4 ml (1400 μ l) **wzorca** = 0,1 ml (100 μ l) wzorca + 0,3 ml (300 μ l) sacharozy + 1 ml (1000 μ l) buforu boranowego.

1,4 ml (1400 μ l) **próby badanej** = 0,05 ml (50 μ l) rozcieńczonej frakcji podkomórkowej zawierającej enzym + 0,15 ml (150 μ l) roztworu substratu + 0,20 ml (200 μ l) buforu fosforanowo-cytrynianowego + 1,0 ml (1000 μ l) buforu boranowego.

Tabela IV.

Objętość 0,5 mM pNP [μ l]	Objętość 250 mM sacharozy [μ l]	Objętość 0,2 M buforu boranowego o pH 9,8 [μ l]	E_{410}	Ilość nmoli pNP w 1,4 ml próby wzorcowej
0	400	1000	0	0
50	350	1000	0,150	12,5
100	300	1000	0,310	25
150	250	1000	0,460	37,5
200	200	1000	0,620	50
300	100	1000	0,930	75
400	0	1000	1,24	100

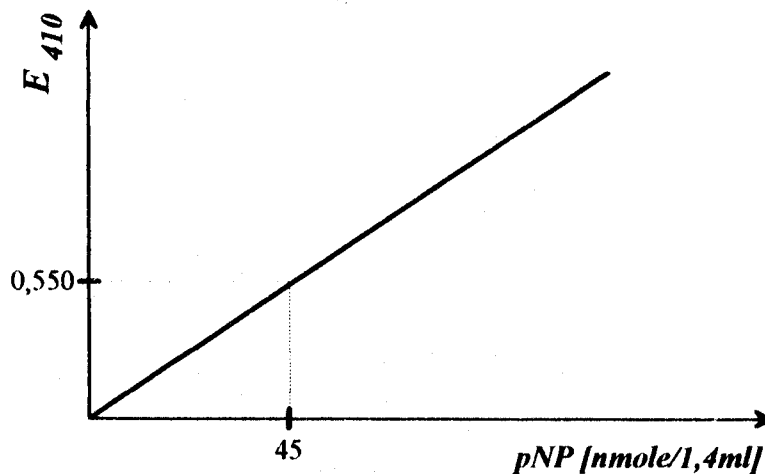
4.1.2. Sporządzanie wykresu kalibracyjnego w/g danych z tabeli IV.:



Ryc. 3. Przykładowy wykres kalibracyjny pNP.

4.1.3. Przykład obliczeń aktywności enzymu w frakcji podkomórkowej:

Ekstynkja 1,4 ml próby 50 × rozcieńczonej, odpowiedniej frakcji podkomórkowej zawierającej enzym, wynosi 0,550, co po odczytaniu z wykresu kalibracyjnego odpowiada 45 nmolom uwolnionego pNP (patrz ryc. 4).



Ryc. 4. Przykład odczytu ilości uwolnionego pNP z wykresu kalibracyjnego.

Znaczy to, że enzym zawarty w 50 μl tej frakcji podkomórkowej rozcieńczonej 50 × uwalnia 45 nmoli pNP w czasie 30 minut (1800 s) inkubacji.

Enzym zawarty w 1 ml (50 razy rozcieńczonej frakcji podkomórkowej) uwalnia 20 (bo w 1 ml frakcji

jest 20 razy więcej białka niż w 50 μ l) \times 45 nmoli pNP w czasie 1800 s, czyli 900 nmoli pNP w czasie 1800 s, co odpowiada 0,5 nmola pNP w czasie 1 s (0,5 nmola pNP/s) lub aktywności 0,5 nanokatala (0,5 nKat).

4.1.4. Obliczanie aktywności całkowitej:

Aktywność enzymu zawartego w 1 ml nierozcieńczonej frakcji podkomórkowej wynosi:

$$50 \text{ (rozcieńczenie)} \times 0,5 \text{ nKat} = 25 \text{ nKat/ml.}$$

Jeżeli objętość frakcji podkomórkowej wynosi np. 40 ml, wtedy aktywność całkowita enzymu wynosi:

$$40 \text{ ml} \times 25 \text{ nKat} = 1000 \text{ nKat.}$$

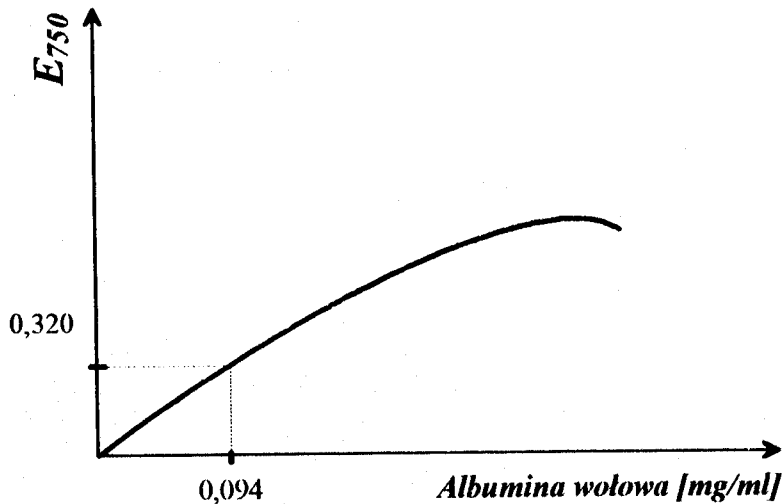
$$\text{Aktywność całkowita frakcji} = \frac{\text{ilość nmoli pNP uwolniona przez 50 } \mu\text{l frakcji podczas inkubacji} \times 20 \times \text{rozcieńczenie} \times \text{objętość frakcji (odczyt z wykresu kalibracyjnego)}}{\text{czas inkubacji [s]}}$$

W naszym przykładzie:

$$\text{Aktywność całkowita frakcji} = \frac{45 \text{ nmoli} \times 20 \times 50 \times 40 \text{ ml}}{1800 \text{ s}} = 1000 \text{ nKat}$$

4.2. Obliczanie stężenia białka:

Jeżeli ekstynkcja mierzona przy długości fali 750 nm dla 100 \times rozcieńczonej frakcji podkomórkowej wynosi np. 0,320, co po odczytaniu z wykresu kalibracyjnego dla albuminy odpowiada 94 μ g/ml białka (ryc. 5.),



Ryc. 5. Przykład odczytu stężenia białka z wykresu kalibracyjnego.

wtedy stężenie białka w nierozcieńczonej frakcji podkomórkowej wynosi:

$$100 \times 94 \mu\text{g/ml} = 9400 \mu\text{g/ml} = 9,4 \text{ mg/ml.}$$

Objętość frakcji wynosi 40 ml,

czyli ilość białka całkowitego we frakcji wynosi $40 \text{ ml} \times 9,4 \text{ mg/ml} = 376 \text{ mg}$.

$$\text{Białko całkowite [mg/obj. frakcji]} = \frac{\text{stężenie białka} \times \text{rozcieńczenie} \times \text{objętość frakcji}}{1000 \text{ (zamiana } \mu\text{g na mg)}}$$

$\frac{[\mu\text{g/ml}] \times \text{(Odczyt z wykresu)}}{1000}$

W naszym przykładzie:

$$\text{Białko całkowite frakcji} = \frac{94 \mu\text{g} \times 100 \times 40 \text{ ml}}{1000} = 376 \text{ mg}$$

4.3. Obliczanie aktywności specyficznej (właściwej):

Jeżeli aktywność enzymu we frakcji podkomórkowej zawierającej 376 mg białka wynosi 1 $\mu\text{Kat} = 1000 \text{ nKat}$,

to 376 mg białka posiada 1000 nKat aktywności
 376 g białka posiada 1000 μKat aktywności

376 kg białka posiada 1000 mKat aktywności
1 kg białka posiada x mKat aktywności
 $x = 2,659$ mKat/kg białka

czyli aktywność specyficzna (właściwa) wynosi 2,659 mKat/kg białka.

4.4. Obliczanie stopnia oczyszczania (na podstawie danych z tabeli III):

$$\text{Stopień oczyszczania} = \frac{\text{Aktywność specyficzna frakcji}}{\text{Aktywność specyficzna homogenatu}}$$

4.5. Obliczanie wydajności (na podstawie danych z tabeli III):

$$\text{Wydajność} = \frac{\text{Aktywność całkowita frakcji}}{\text{Aktywność całkowita homogenatu}} \times 100\%$$

5. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 3

Temat: Ogólne właściwości N-acetylo- β -heksozoaminidazy

Podstawy teoretyczne

1. Ogólna charakterystyka enzymów.
2. Inaktywacja i stabilizacja enzymów.
3. Budowa i funkcje enzymów.

Literatura

1. Harper H.A. i wsp., (1983): Zarys chemii fizjologicznej, PZWL, Warszawa, s. 64-112.
2. Witwicki J., Ardelt W. (red.), (1984): Elementy enzymologii, PWN, Warszawa, s. 11-109.
3. Stryer L., (1986): Biochemia, PWN, Warszawa, s. 124-161.
4. Filipowicz B., Więckowski W., (1990): Biochemia, PWN, Warszawa-Lódź, t. I, s. 362-407.
5. Zwierz K. i wsp., (1992): N-acetylo- β -heksozoaminidaza - enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa., Postępy Biochemii, t. 38, nr 3, s.127-132.
6. Ostrowska L. i wsp., (1993): Rola, właściwości i znaczenie kliniczne N-acetylo- β -heksozoaminidazy., Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, t. 47, nr 1, s. 67-79.

Cel ćwiczenia

Przedstawienie w formie wykresów zależności:

- 1) aktywności enzymu od stężenia białka,
- 2) ilości zhydrolizowanych wiązań od czasu inkubacji,
- 3) aktywności enzymu od pH mieszaniny inkubacyjnej.

Odczynniki

- 1) 0,25 mM p-nitrofenol (pNP) w buforze fosforanowo-cytrynianowym w/g Mc Ilvaine o pH 4,7;
- 2) substrat (138 mg p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu w 60 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7);
- 3) wzorzec białka (30 mg% roztwór albuminy wołowej);
- 4) bufor fosforanowo-cytrynianowy w/g Mc Ilvaine o pH 4,7;
- 5) 154 mM KCl zawierający 0,2% Tritonu X-100;
- 6) odczynnik Folina i Ciocalteau;
- 7) odczynnik miedziowy;
- 8) 200 mM bufor boranowy o pH 9,8;
- 9) 154 mM KCl.

Wykonanie

1. Wykresu kalibracyjnego p-nitrofenolu (pNP)

1.1. Sporządzenie wzorca:

7 mg p-nitrofenolu (pNP) rozpuścić w 200 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7 (roztwór pNP jest 0,25 mM) (na stołach laboratoryjnych znajduje się odczynnik przygotowany do pracy).

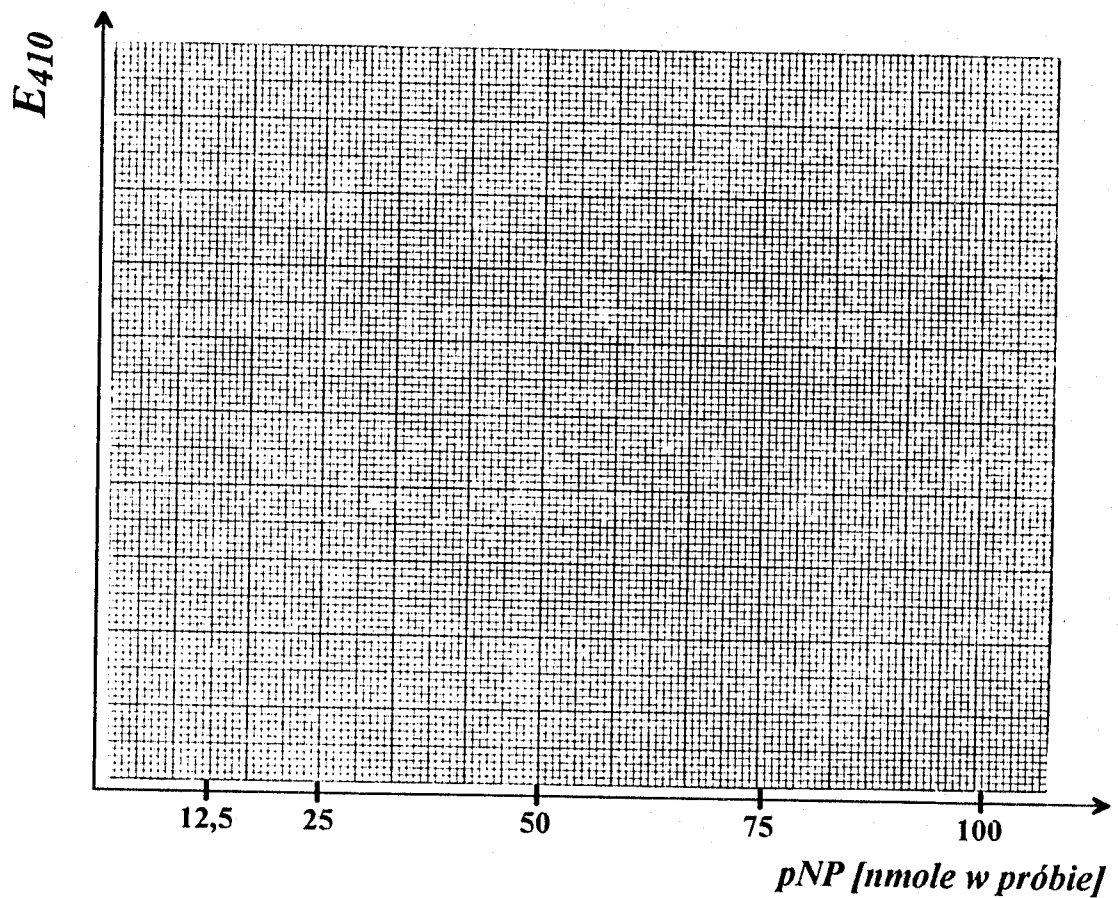
1.2. Wykonanie rozcieńczeń wzorca

Wzorzec należy rozcieńczyć w/g tabeli I, a wartości ekstynkcyjności odczytanych na spektrofotometrze przy długości fali 410 nm wpisać w odpowiednią kolumnę w tej tabeli:

Tabela I.

Nr próby	Objętość wzorca (0,25 mM pNP) [ml]	Objętość 154 mM KCl z 0,2% TX-100 [ml]	Objętość 200 mM buforu boranowego o pH 9,8 [ml]	Ilość nmoli pNP w próbce	Wartość E_{410}
0	-	0,4	1,0	0	
1	0,05	0,35	1,0	12,5	
2	0,1	0,3	1,0	25	
3	0,2	0,2	1,0	50	
4	0,3	0,1	1,0	75	
5	0,4	-	1,0	100	

1.3. Sporządzić wykres kalibracyjny pNP:



Ryc. 1. Wykres kalibracyjny pNP.

2. Wykres kalibracyjny albuminy wołowej

2.1. Sporządzenie wzorca:

30 mg liofilizowanej albuminy wołowej rozpuścić w 100 ml 154 mM KCl (na stołach laboratoryjnych znajduje się odczynnik przygotowany do pracy).

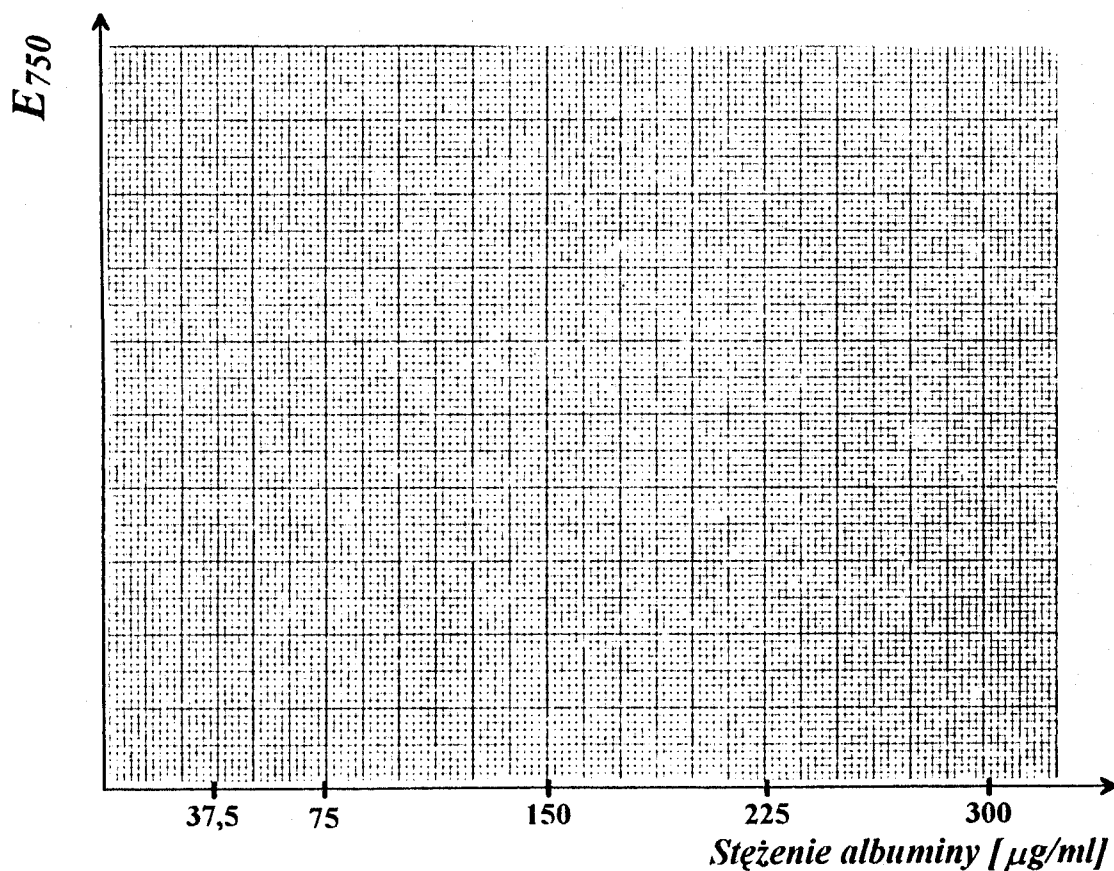
2.2. Wykonanie rozcieńczeń wzorca:

Wzorec albuminy należy rozcieńczyć w/g tabeli II. Oznaczyć wartości ekstynkcji w/g punktu 3 i wpisać w odpowiednią kolumnę w tabeli II:

Tabela II.

Nr próby	Objętość roztworu albuminy [ml]	Objętość 154 mM KCl [ml]	Stężenie albuminy [$\mu\text{g/ml}$]	Wartość E_{750}
0	-	0,4	0	
1	0,05	0,35	37,5	
2	0,1	0,3	75,0	
3	0,2	0,2	150,0	
4	0,3	0,1	225,0	
5	0,4	-	300,0	

2.3. Sporządzić wykres kalibracyjny albuminy:



Ryc. 2. Wykres kalibracyjny albuminy.

3. Oznaczanie stężenia białka

3.1. Odczynniki (na stołach laboratoryjnych znajdują się odczynniki przygotowane do pracy):

3.1.1. Odczynnik Folina i Ciocalteu rozcieńczony wodą dest. w stosunku 1:2.

3.1.2. Odczynnik miedziowy:

1 ml 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ w 1% cytrynianie sodu rozcieńczyć 50 ml 2% Na_2CO_3 w 0,1 N NaOH.

3.2. Postępowanie:

Do 0,4 ml próby dodać 2 ml odczynnika miedziowego sporządzonego bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia. Po 10 min. do powyższej mieszaniny dodać podczas stałego mieszania na wstrząsarce 0,2 ml odczynnika Folina i Ciocalteu. Próby odstawić na 30 minut w temperaturze laboratoryjnej.

Ekstynkcję mierzyć przy użyciu spektrofotometru przy długości fali 750 nm. Stężenie białka odczytać z wykresu kalibracyjnego sporządzonego z liofilizowanej albuminy wołowej.

4. Surowy wyciąg

4.1. Otrzymywanie:

Umieścić tkankę szczura (np. wątrobę lub nerkę) w 154 mM KCl zawierającym 0,2% Tritonu X-100, biorąc 4 ml roztworu KCl na 1 g tkanki. Homogenizować homogenizatorem nożowym przez 2 min. Homogenat odwirować przy $10.000 \times g$ przez 30 minut (12.000 obrotów/minutę, wirówka *Unipan* typ 310). Do dalszych badań zachować płyn nadosadowy.

4.2. Oznaczanie białka:

Należy wykonać rozcieńczenia surowego wyciągu enzymatycznego w/g tabeli IV:

a) wątroby: $20 \times$, $60 \times$ i $100 \times$ lub

b) nerki: $50 \times$, $100 \times$ i $200 \times$;

i oznaczyć stężenie białka w/g przepisu podanego w punkcie 3.2. Wartości ekstynkcji (E_{750}) i odczytanych z wykresu kalibracyjnego stężeń białka w rozcieńczonym i nierozcieńczonym wyciągu enzymatycznym wpisać do tabeli III. Średnie stężenie białka [mg/ml] zostanie wykorzystane w tabeli IV.

Tabela III.

Rozcieńczenie		Wartość E_{750}	Stężenie białka [$\mu\text{g/ml}$]		
Wątroba	Nerka		Rozcieńczonego wyciągu	Nierozcieńczonego wyciągu	Średnia
20 ×	50 ×				
60 ×	100 ×				
100 ×	200 ×				

5. Wyznaczenie zależności między stężeniem białka w wyciągu enzymatycznego a aktywnością enzymu

5.1. Rozcieńczanie wyciągu enzymatycznego:

Tabela IV.

Nr próby	Średnia zawartość białka w 50 μl nierozcieńczonego wyciągu enzymatycznego [μg] (w/g tabeli III)	Objętość wyciągu enzymatycznego [μl]		Objętość 154 mM KCl dodanego do wyciągu enzymatycznego [ml]		Rozcieńczenia wyciągu enzymatycznego		Zawartość białka w 50 μl odpowiednio rozcieńczonego wyciągu enzymatycznego [μg]
		z wątroby	z nerki	z wątroby	z nerki	z wątroby	z nerki	
1		100	20	0,9	0,98	10 ×	50 ×	
2		100	20	1,9	1,98	20 ×	100 ×	
3		100	20	3,9	2,98	40 ×	150 ×	
4		100	20	5,9	3,98	60 ×	200 ×	
5		100	20	7,9	4,98	80 ×	250 ×	
6		100	20	9,9	5,98	100 ×	300 ×	

5.2. Przykład obliczeń do tabeli IV:

Jeżeli średnie stężenie białka w nierozcieńczonym wyciągu enzymatycznym wątroby (w/g tabeli III)

wynosi $9,4 \text{ mg} = 9400 \text{ } \mu\text{g}$, w 1 ml, to po 10 - krotnym rozcieńczeniu jest $940 \text{ } \mu\text{g}$ białka w 1 ml. Z uwagi na to, że $50 \text{ } \mu\text{l} = 1/20 \text{ ml}$, to w $50 \text{ } \mu\text{l}$ surowego wyciągu będzie 20 razy mniej białka niż w 1 ml, czyli $940 \text{ } \mu\text{g} \times 1/20 = 47 \text{ } \mu\text{g}$ białka w $50 \text{ } \mu\text{l}$ rozcieńczonego 10 razy wyciągu z wątroby.

5.3. Oznaczanie aktywności N-acetylo- β -heksozoaminidazy inkubatów zawierających różne stężenia białka wyciągu enzymatycznego:

Do 14 probówek oznakowanych 0, 0; 1, 1; 2, 2; 3, 3; 4, 4; 5, 5; 6, 6; odmierzyć po $150 \text{ } \mu\text{l}$ substratu (p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu). Następnie do każdej probówki dodać po $200 \text{ } \mu\text{l}$ buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7. Do probówek oznaczonych „0” dodać po $50 \text{ } \mu\text{l}$ 154 mM KCl z 0,2% Tritonem X-100, a do pozostałych probówek dodać odpowiednio po $50 \text{ } \mu\text{l}$ rozcieńczonego wyciągu enzymatycznego sporządzonego w/g tabeli w punkcie 5.1. Zawartość probówek wymieszać i inkubować przez 30 minut w łaźni wodnej w temperaturze 37°C . Próby wyjąć z łaźni, oziębic i dodać po 1 ml $0,2 \text{ M}$ buforu boranowego o pH 9,8.

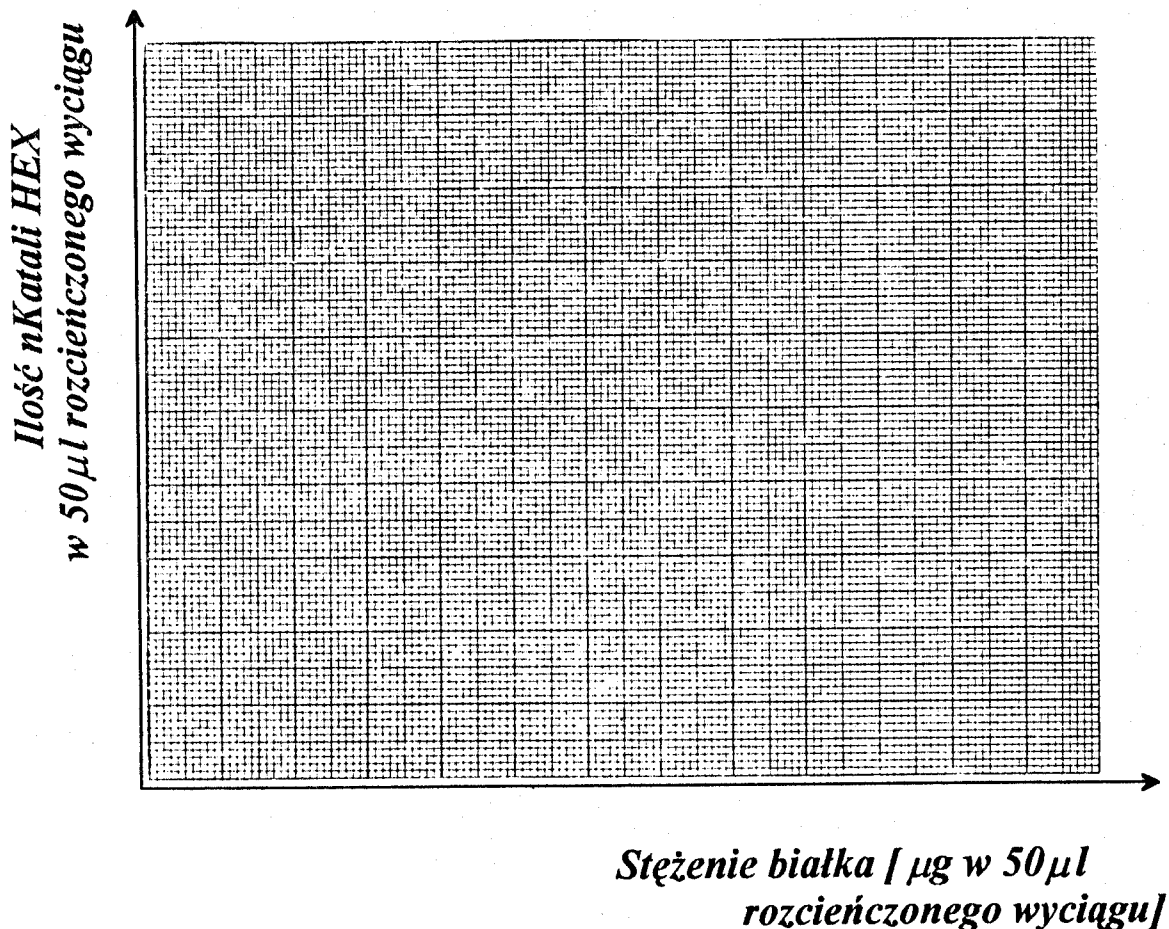
5.4. Oznaczanie uwolnionego pNP w płynie poinkubacyjnym:

Tabela V.

Nr próby	Wartość E_{410}	Ilość nmoli uwolnionego pNP przez enzym zawarty w $50 \text{ } \mu\text{l}$ rozcieńczonego wyciągu w czasie 30 minut (Odczyt z wykresu kalibracyjnego)		Stężenie białka w $\mu\text{g}/50 \text{ } \mu\text{l}$ rozcieńczonego wyciągu (w/g tabeli IV.)
			Średnia	
1				
1				
2				
2				
3				
3				
4				
4				
5				
5				
6				
6				

Na spektrofotometrze odczytać ekstynkcje przy długości fali 410 nm w stosunku do próby kontrolnej (próbówki oznaczone „0”) i wartości wpisać w tabeli. Wartości stężeń powstałego pNP odczytać z wykresu kalibracyjnego i wpisać w tabeli V. Aktywność 50 μ l wyciągu (rozcieńczonego w/g tabeli IV) obliczyć korzystając z przykładu zamieszczonego w opisie do ćwiczenia 2 pkt. 4.

5.5. Sporządzić wykres zależności aktywności N-acetylo- β -heksozoaminidazy (HEX) od stężenia białka:



Ryc. 3. Zależność aktywności HEX od stężenia białka (dane w/g tabeli V).

6. Wyznaczanie zależności między ilością zhydrolizowanych wiązań glikozydowych a czasem inkubacji

6.1. Inkubacja:

Do 12 próbek oznakowanych 0, 0; 1, 1; 2, 2; 3, 3; 4, 4; 5, 5 odmierzyć po 150 μ l substratu

(p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu). Następnie do każdej probówki dodać po 200 μ l buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7. Probówki wstawić na 5 minut do łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Następnie do każdej probówki dodać po 50 μ l 40 razy (z wątroby) lub 150 razy (z nerki) rozcieńczonego (w/g tabeli IV) wyciągu enzymatycznego. Do probówek oznaczonych „0” dodać natychmiast po 1 ml 0,2 M buforu boranowego o pH 9,8. Zawartość pozostałych probówek inkubować w łaźni o temperaturze 37°C. Po 15 minutach inkubacji do probówek oznaczonych „1” dodać po 1 ml buforu boranowego i co kolejne 15 minut do dalszych probówek oznaczonych odpowiednio kolejnymi numerami.

6.2. Oznaczanie uwolnionego pNP w płynie poinkubacyjnym:

Tabela VI.

Nr próby	Stężenie białka w $[\mu\text{g}/50 \mu\text{l}]$ rozcieńczonego wyciągu (w/g tabeli IV)	Czas inkubacji [minuty]	Wartość E_{410}	Ilość nmoli pNP uwolniona przez enzym zawarty w 50 μ l rozcieńczonego wyciągu (Odczyt z wykresu kalibracyjnego)		Ilość moli zhydrolizowanych wiązań glikozydowych przez 1 kg białka
					Średnia	
1		15				
1						
2		30				
2						
3		45				
3						
4		60				
4						
5		75				
5						

Na spektrofotometrze odczytać ekstynkcje przy długości fali 410 nm w stosunku do próby kontrolnej (probówki oznaczone „0”) i wpisać do odpowiedniej kolumny w tabeli. Wartości stężeń powstałego pNP odczytać z wykresu kalibracyjnego i wpisać do odpowiedniej kolumny w tabeli VI.

6.3. Przykład obliczeń:

Jeżeli średnie stężenie białka w nierozcieńczonym wyciągu wątroby (w/g tabeli III) wynosi 9,4 mg = 9400 μ g w 1 ml, to po 40 - krotnym rozcieńczeniu (w/g tabeli IV) jest 235 μ g białka /ml i 50 μ l tego

wyciągu zawiera:

$$235 \mu\text{g} \div 20 = 11,75 \mu\text{g} \text{ białka.}$$

Jeżeli E_{410} po 30 minutach wynosi 0,550 to po odczytaniu z krzywej wzorcowej pNP odpowiada 45 nmolom pNP,

stąd: 11,75 μg białka wyciągu wątroby uwalnia 45 nmoli pNP w czasie 30 minut inkubacji,

11,75 mg białka wyciągu wątroby uwalnia 45 μmoli pNP w czasie 30 minut inkubacji,

11,75 g białka wyciągu wątroby uwalnia 45 mmoli pNP w czasie 30 minut inkubacji,

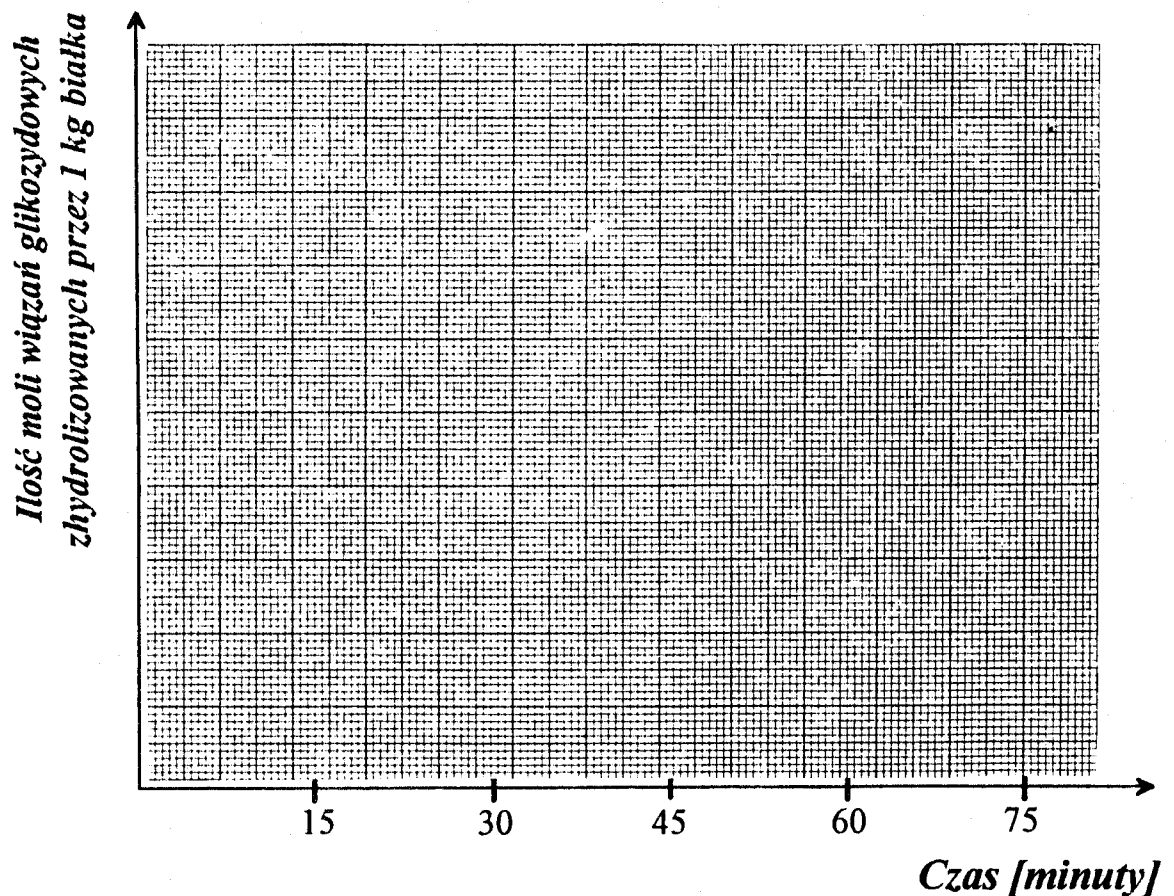
11,75 kg białka wyciągu wątroby uwalnia 45 moli pNP w czasie 30 minut inkubacji,

1 kg białka wyciągu wątroby uwalnia x pNP w czasie 30 minut inkubacji,

$$x = 45 \text{ moli} \div 11,75 \text{ kg} = 3,83 \text{ mola/kg}$$

czyli 1 kg białka wyciągu wątroby uwalnia 3,83 mola pNP w czasie 30 minut.

6.4. Sporządzić wykres zależności ilości zhydrolizowanych wiązań glikozydowych od czasu inkubacji:



Ryc. 4. Zależność ilości zhydrolizowanych wiązań glikozydowych od czasu inkubacji.

7. Wpływ pH na reakcję katalizowaną przez N-acetylo- β -heksozoaminidazę

7.1. Przygotowanie mieszanin inkubacyjnych

Do próbek oznaczonych 1, 1; 2, 2; 3, 3; 4, 4; 5, 5 dodać po 150 μ l substratu oraz po 200 μ l buforu fosforanowo-cytrynianowego o odpowiednim pH w/g tabeli VII.

Następnie do tych próbek dodać po 50 μ l 40 razy (z wątroby) lub 150 razy (z nerki) rozcieńczonego (w/g tabeli IV) wyciągu enzymatycznego i inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 30 minut. Po tym czasie do każdej próbki dodać 1 ml buforu boranowego o pH 9,8. Do próbki oznaczonej „0” odmierzyć 150 μ l substratu, 200 μ l buforu fosforanowo- -cytrynianowego o pH 4,7, 1 ml buforu boranowego o pH 9,8 i 50 μ l 40 razy (z wątroby) lub 150 razy (z nerki) rozcieńczonego wyciągu enzymatycznego.

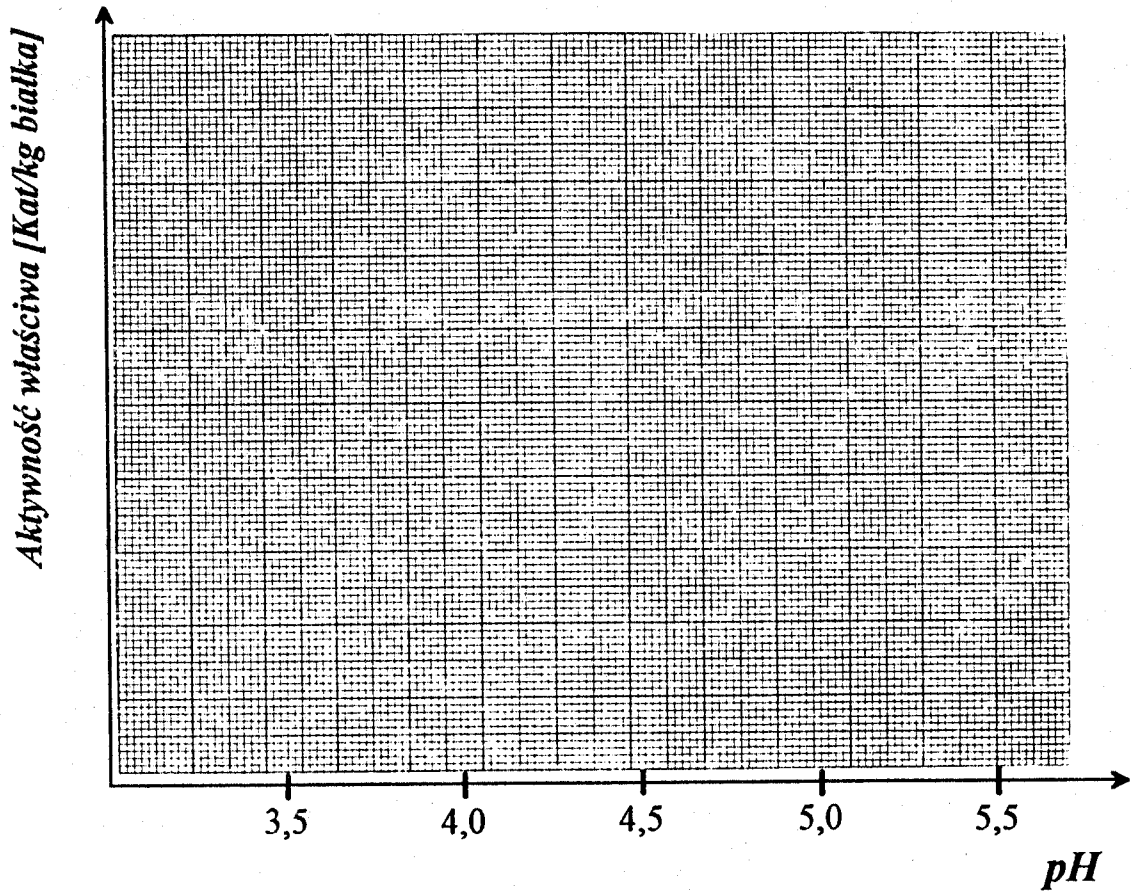
Tabela VII.

Nr próbek	pH buforu	Wartość E_{410}	Ilość nmoli pNP uwolnionego przez enzym zawarty w 50 μ l rozcieńczonego wyciągu enzymatycznego w czasie 30 minut (Odczyt z wykresu kalibracyjnego)		Aktywność właściwa (specyficzna) [Kat/kg białka]
				Średnia	
1	3,5				
1					
2	4,0				
2					
3	4,5				
3					
4	5,0				
4					
5	5,5				
5					

7.2. Oznaczenie uwolnionego pNP w płynie poinkubacyjnym:

Na spektrofotometrze odczytać ekstynkcje przy długości fali 410 nm w stosunku do próby kontrolnej (próbki oznaczone „0”) i wpisać w powyższej tabeli. Wartości stężeń powstałego pNP odczytać z wykresu kalibracyjnego i wpisać w tabeli. Obliczyć aktywności właściwe (specyficzne) (sposób obliczania opisano przy ćwiczeniu 2 w pkt. 4) i wpisać w odpowiednią kolumnę w tabeli VII.

7.3. Sporządzić wykres zależności aktywności właściwej (specyficznej) enzymu od pH mieszaniny inkubacyjnej:



Ryc. 5. Wykres zależności aktywności właściwej (specyficznej) HEX od pH mieszaniny inkubacyjnej.

8. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 4

Temat: Wyznaczanie szybkości maksymalnej (V_{max}) reakcji enzymatycznej i stałej Michaelisa (K_M) dla N-acetylo- β -heksozoaminidazy

Podstawy teoretyczne

1. Szybkość reakcji enzymatycznej.
2. Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji enzymatycznej.
3. Szybkość maksymalna (V_{max}) reakcji enzymatycznej.
4. Stała Michaelisa (K_M).
5. Graficzne metody wyznaczania stałej Michaelisa.

Literatura

1. Bowers Jr., G.N. i wsp., (1975): Provisional Recommendation (1974) on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes., The Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry (J.Clin.Chem.Clin.Biochem.), t. 13, s. 471-478.
2. Zgirski A., Gondko R., (1976): Obliczenia biochemiczne, PWN, Warszawa, s. 264-318.
3. Harper H.A. i wsp., (1983): Zarys chemii fizjologicznej, PZWL, Warszawa, s. 83-89.
4. Witwicki J., Ardelt W. (red.), (1984): Elementy enzymologii, PWN, Warszawa, s. 36-38, 111-127.
5. Filipowicz B., Więckowski W., (1990): Biochemia, PWN, Warszawa-Lódź, t. I, s. 362-407.

Cel ćwiczenia

1. Wyznaczenie szybkości maksymalnej (V_{max}) reakcji enzymatycznej.
2. Wyznaczenie stałej Michaelisa (K_M).

Odczynniki

- 1) 200 mM bufor boranowy o pH 9,8;
- 2) bufor fosforanowo-cytrynianowy w/g Mc Ilvaine o pH 4,7;
- 3) p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozyd (substrat) w buforze fosforanowo-cytrynianowym w/g Mc Ilvaine o pH 4,7 (pNPNAG);
- 4) 154 mM KCl zawierający 0,2% Tritonu X-100;
- 5) 0,25 mM p-nitrofenol (pNP) w buforze fosforanowo-cytrynianowym w/g Mc Ilvaine o pH 4,7.

Wykonanie

1. Sporządzenie roztworu substratu

138 mg p-nitrofenylo-2-amino-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu rozpuścić w 60 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7 (na stołach znajduje się odczynnik przygotowany do pracy).

2. Przygotowanie homogenatów tkankowych

Umieścić tkankę szczura lub człowieka (wątrobę, nerkę, błonę śluzową jelita lub żołądka) w 154 mM KCl zawierającym 0,2% Tritonu X-100 biorąc 4 ml roztworu KCl na 1 g tkanki. Homogenizować homogenizatorem nożowym przez 2 minuty. Homogenat odwirować przy $10.000 \times g$ w ciągu 30 minut. (12.000 obrotów/minutę, wirówka *Unipan* typ 310). Do dalszych badań zachować płyn nadosadowy.

3. Wykres kalibracyjny p-nitrofenolu (pNP)

3.1. Sporządzenie wzorca:

7 mg p-nitrofenolu (pNP) rozpuścić w 200 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7 (roztwór jest 0,250 mM) (na stołach znajduje się odczynnik przygotowany do pracy).

3.2. Wykonanie rozcieńczeń wzorca:

Wzorzec należy rozcieńczyć w/g tabeli I. i używając spektrofotometru odczytać wartości ekstynkcji przy długości fali 410 nm. Odczytane wartości wpisać w odpowiednią kolumnę tabeli:

Tabela I.

Nr próbówki	Objętość wzorca (0,25 mM pNP) [ml]	Objętość 154 mM KCl z 0,2% TX-100 [ml]	Objętość 200 mM buforu boranowego o pH 9,8 [ml]	Ilość nmoli pNP w próbce	Wartość E_{410}
0	-	0,4	1,0	0	
1	0,05	0,35	1,0	12,5	
2	0,1	0,3	1,0	25	
3	0,2	0,2	1,0	50	
4	0,3	0,1	1,0	75	
5	0,4	-	1,0	100	

4. Inkubacja substratu z wyciągiem enzymatycznym i oznaczanie uwolnionego p-nitrofenolu (pNP)

4.1. Sporządzanie rozcieńczeń substratu:

Do 5 probówek o numerach I, II, III, IV i V dodać odpowiednio 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 i 0,5 ml substratu oraz 0,99; 0,95; 0,9; 0,8 i 0,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7.

4.2. Inkubacja:

Do 10 probówek ponumerowanych 1, 1; 2, 2; 3, 3; 4, 4; 5, 5; dodać po 150 μ l rozcieńzonego substratu odpowiednio z probówek I, II, III, IV i V, a do 2 probówek o numerach 6 i 6 dodać po 150 μ l substratu nierozcieńzonego. Następnie do każdej probówki dodać po 200 μ l buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7 i po 50 μ l wyciągu enzymatycznego, który należy uprzednio rozcieńczyć buforem fosforanowo-cytrynianowym w/g Mc Ilvaine o pH 4,7 w następujący sposób:

- a) wyciąg z wątroby szczura 100 \times ,
- b) wyciąg z nerki szczura 200 \times .

Do dwóch probówek oznaczonych „0” dodać po 350 μ l buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7, po 1 ml buforu boranowego o pH 9,8 i po 50 μ l odpowiednio rozcieńzonego wyciągu enzymatycznego. Zawartość pozostałych probówek inkubować przez 30 minut w łaźni o temperaturze 37°C. Po inkubacji dodać do inkubowanych probówek po 1 ml buforu boranowego o pH 9,8.

4.3. Oznaczenie uwolnionego pNP w płynie po inkubacji:

Na spektrofotometrze odczytać ekstynkcję przy długości fali 410 nm w stosunku do próby kontrolnej (probówki oznaczone „0”). Wartości stężeń uwolnionego pNP odczytać z wykresu kalibracyjnego.

5. Obliczenie zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu i sporządzenie wykresu tej zależności

5.1. Obliczanie stężeń substratu [S] (pNPNAG) w mieszaninach inkubacyjnych:

Masa molowa p-nitrofenylo-N-acetyloglukozaminy (pNPNAG) wynosi 342,3 g.

w 60.000 μ l (60 ml) roztworu substratu jest 138 mg pNPNAG

w 150 μ l roztworu substratu jest x pNPNAG

$$x = 0,345 \text{ mg}$$

w 400 μ l mieszaniny inkubacyjnej jest 0,345 mg pNPNAG

(150 μ l substratu + 50 μ l enzymu + 200 μ l buforu)

w 1.000.000 μ l (1000 ml = 1 dm³) jest y pNPNAG

$$y = 862,5 \text{ mg}$$

1 mmol pNPAG waży 342,3 mg
 z mmoli pNPAG waży 862,5 mg
 $z = 2,5 \text{ mmola pNPAG/dm}^3$,

czyli stężenie substratu (pNPAG) w inkubacji wynosi $2,5 \text{ mmola/dm}^3$.

W tabeli II przedstawiono przykładowe wyliczenia stężenia substratu w kolejnych próbach inkubatu.

Tabela II.

Nr próbki	Objętość nierozcieńczonego substratu [ml]	Objętość buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 [ml]	Stężenie substratu (pNPAG) w inkubacji		Rozcieńczenie
			[mmoli/dm ³]	[moli/dm ³]	
0	-	1,00	0,0	0,0	-
1	0,01	0,99	0,025	$2,5 \times 10^{-5}$	100 ×
2	0,05	0,95	0,125	$1,25 \times 10^{-4}$	20 ×
3	0,10	0,90	0,250	$2,5 \times 10^{-4}$	10 ×
4	0,20	0,80	0,500	$5,0 \times 10^{-4}$	5 ×
5	0,50	0,50	1,250	$1,25 \times 10^{-3}$	2 ×
6	1,00	-	2,500	$2,5 \times 10^{-3}$	-

5.2. Obliczanie stężenia aktywności enzymatycznej*¹) (v) inkubatu:

Wyniki oznaczeń przyrostu stężenia pNP w inkubacji należy zestawzić w tabeli III i wyliczyć stężenie aktywności enzymatycznej (v) inkubatu w/g przykładu podanego w punkcie 7:

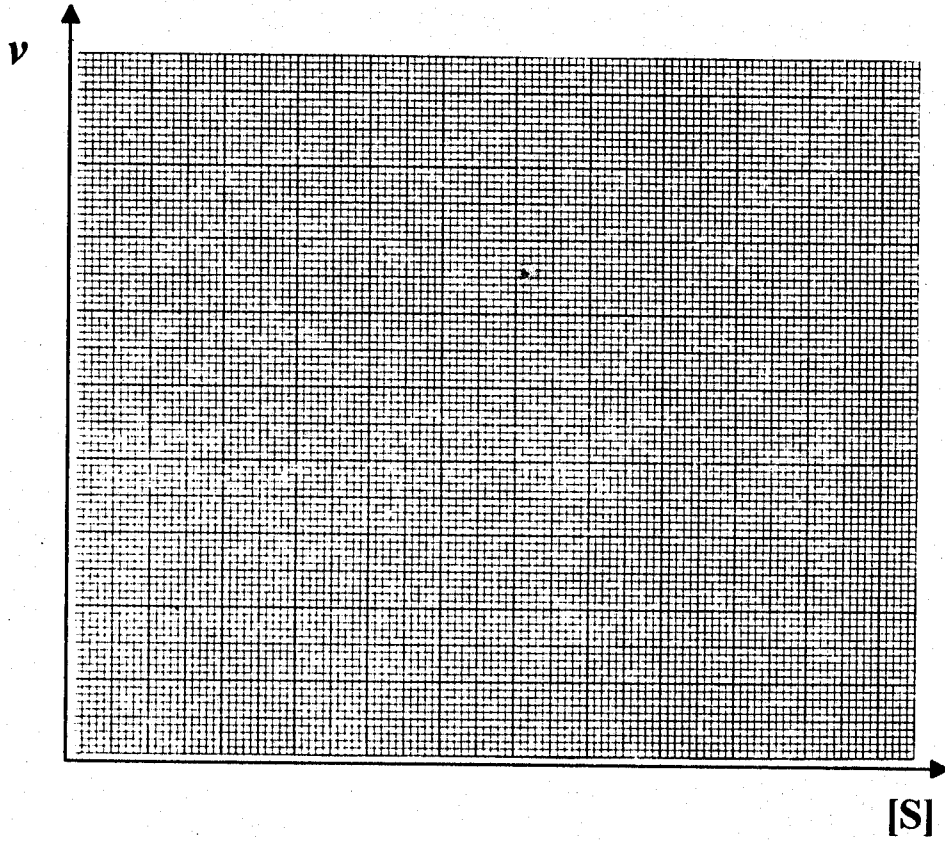
*¹) Komisja Nomenklatury Biochemicznej UPAC i JUB zaleciła nazwę: „*enzymic activity concentration*”, określaną w katalach/dm³ [l]. Termin „*stężenie aktywności enzymatycznej*” jest tłumaczeniem tej nazwy.

Tabela III.

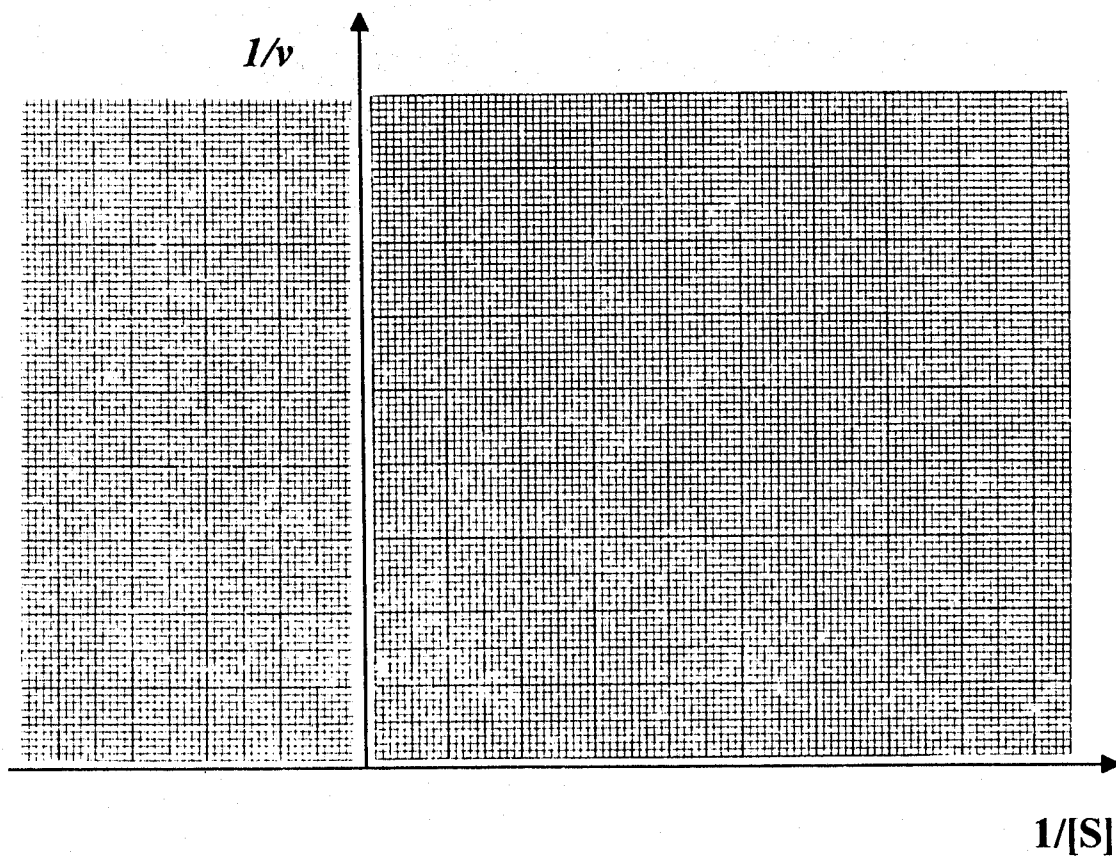
Nr próbki	Wartość E_{410}	Przyrost pNP w ciągu 30 min.			Stężenie aktywności enzymatycznej (v) inkubatu [nKat/dm ³]
		w 400 μ l inkubatu	w 1 dm ³ inkubatu	Śr. w 1 dm ³ inkubatu	
1					
1					
2					
2					
3					
3					
4					
4					
5					
5					
6					
6					

6. Sporządzanie wykresów zależności szybkości reakcji enzymatycznej (v) od stężenia substratu [S]

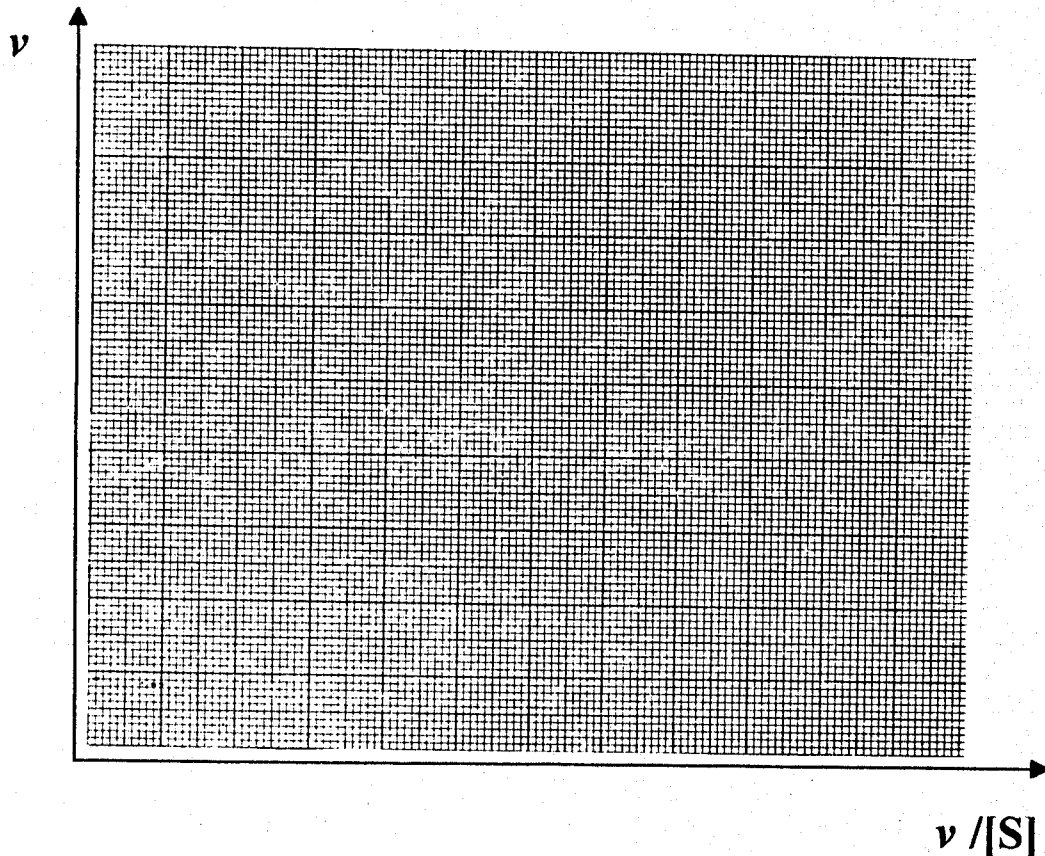
6.1. Metodą w/g Michaelisa-Mentena (patrz przykład w punkcie 8.1.):



6.2. Metodą w/g Lineweavera-Burka (patrz przykład w punkcie 8.2.):



6.3. Metodą w/g Hofstee-Eadiego (patrz przykład w punkcie 8.3.):

7. Przykład obliczeń stężenia aktywności enzymatycznej (v) inkubatu:

Jeżeli E_{410} wynosi 0,550 to odpowiada ona 45 nmolom powstałego pNP w 400 μl inkubatu,

w 400 μl inkubatu powstaje 45 nmoli pNP w czasie 30 min.

w 1.000.000 μl (1 dm^3) powstaje x nmoli pNP w czasie 30 min.

$$x = 112.500 \text{ nmoli pNP w } 1 \text{ dm}^3 \text{ inkubatu}$$

w czasie 1800 sek (30 min) powstaje 112.500 nmoli pNP w 1 dm^3 inkubatu

w czasie 1 sek powstaje y nmoli pNP w 1 dm^3 inkubatu

$$y = 62,5 \text{ nmoli / sek / dm}^3;$$

czyli stężenie aktywności N-acetylo- β -heksozoaminidazy w inkubacji wynosi 62,5 nKat / dm^3 .

8. Przykłady graficznego przedstawienia zależności szybkości reakcji od stężenia substratu

v - szybkość reakcji enzymatycznej (stężenie aktywności enzymatycznej w dm^3 inkubatu),

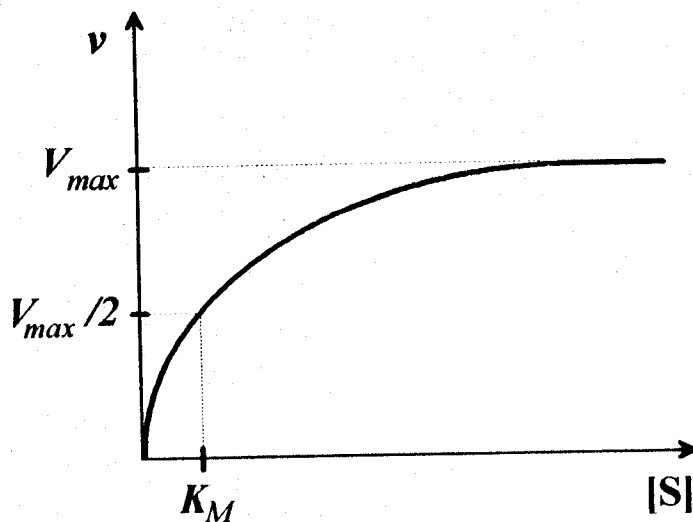
V_{max} - szybkość maksymalna,

$[S]$ - stężenie substratu,

K_M - stała Michaelisa;

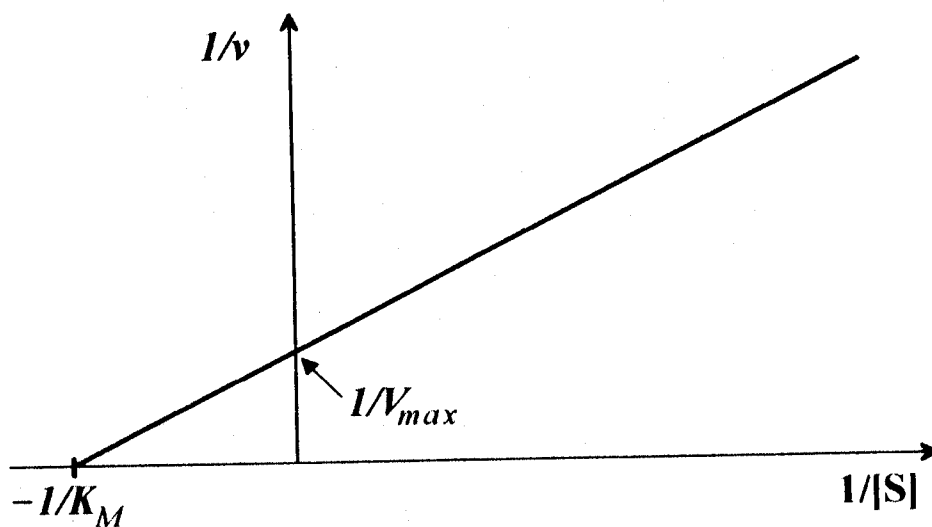
8.1. w/g Michaelisa-Mentena:

$$v = V_{max} [S] \div K_M + [S]$$



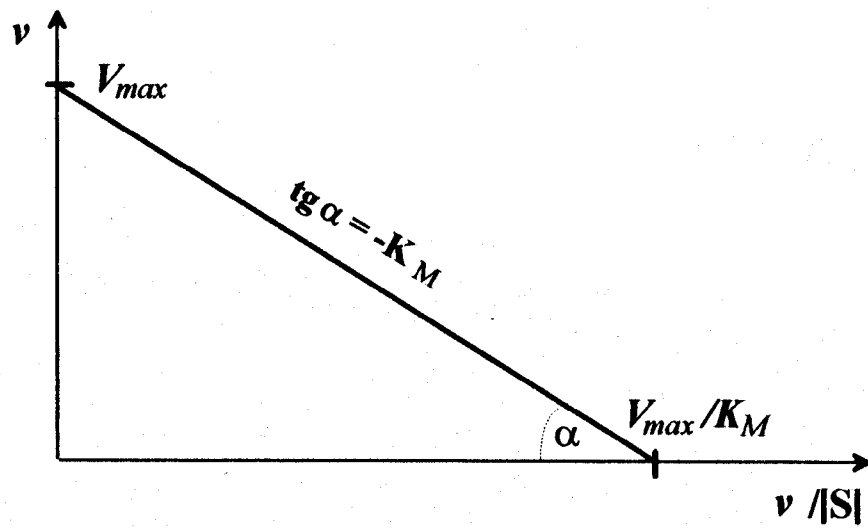
8.2. w/g Lineweavera-Burka:

$$1 \div v = K_M + [S] \div V_{max} [S]$$



8.3. w/g Hofstee-Eadiego:

$$v = \frac{V_{max}}{K_M + [S]}$$



9. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 5

Temat: Izoenzymy N-acetylo- β -heksozoaminidazy

Podstawy teoretyczne

1. Definicja i znaczenie biologiczne izoenzymów.
2. Budowa N-acetylo- β -heksozoaminidazy.
3. Metody wykrywania i oznaczania izoenzymów N-acetylo- β -heksozoaminidazy.

Literatura

1. Filipowicz B., Więckowski W., (1979): Zarys biochemii, PZWL, Warszawa, s. 109-110.
2. Harper H.A., i wsp. (1983): Zarys chemii fizjologicznej, PZWL, Warszawa, s. 106-107.
3. Rynkiewicz B., (1985): Oznaczanie aktywności całkowitej N-acetylo- β -D-glukozaminidazy oraz izoenzymu B w preparatach biopsyjnych błony śluzowej ludzkiego żołądka., Praca magisterska, Akademia Medyczna, Białystok.
4. Cylwik B., (1986): Oczyszczanie i właściwości izoenzymów N-acetylo- β -D-glukozaminidazy A i B z błony śluzowej ludzkiego żołądka., Praca magisterska, Akademia Medyczna, Białystok.
5. Zapałowicz J., (1987): Analiza elektroforetyczna izoenzymów β -heksozaminidazy błony śluzowej ludzkiego żołądka., Praca magisterska, Akademia Medyczna, Białystok.
6. Filipowicz B., Więckowski W., (1990): Biochemia, PWN, Warszawa-Lódź, t. I, s. 380-384.
7. Zwierz K. i wsp., (1992): N-acetylo- β -D-heksozoaminidaza - enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa., Postępy Biochemii, t.38, nr 3, s.127-132.
8. Ostrowska L. i wsp., (1993): Rola, właściwości i znaczenie kliniczne N-acetylo- β -heksozoaminidazy., Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, t. 47, nr 1, s. 67-79.

Cel ćwiczenia

1. Rozdział izoenzymów N-acetylo- β -heksozoaminidazy A i B na octanie celulozy.
2. Wykazanie wpływu podwyższonej temperatury i obniżonego pH na stabilność izoenzymów N-acetylo- β -heksozoaminidazy A i B.

Odczynniki

- 1) bufor elektrodowy (50 mM bufor fosforanowy o pH 6,0);
- 2) bufor fosforanowo-cytrynianowy w/g Mc Ilvaine o pH 2,8;
- 3) bufor fosforanowo-cytrynianowy w/g Mc Ilvaine o pH 5,0;
- 4) bufor fosforanowo-cytrynianowy w/g Mc Ilvaine o pH 5,5;
- 5) substrat I (0,02% roztwór 4-metylo-umbeliferylo-N-acetylo- β -glukozaminidu w buforze fosforanowo-cytrynianowym w/g Mc Ilvaine o pH 4,0);

- 6) 30% metanol;
- 7) substrat II (138 mg p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu rozpuszczono w 60 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,7);
- 8) bufor fosforanowo-cytrynianowy w/g Mc Ilvaine o pH 4,7;
- 9) 200 mM bufor boranowy o pH 9,8.

Wykonanie

1. Przygotowanie pasków z octanu celulozy

Przed rozpoczęciem elektroforezy należy na czterech paskach z octanu celulozy o wymiarach 120 × 25 mm narysować zwykłym ołówkiem linię startu w odległości 4 cm od krótkiego boku oraz zaznaczyć (+) - koniec anodowy i (-) - koniec katodowy. Następnie paski należy wymoczyć przez dobę w 30% metanolu, wypłukać dwa razy wodą destylowaną i umieścić w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,0 na 15-30 minut. Przed umieszczeniem paska w aparacie do elektroforezy usunąć nadmiar buforu bibułą filtracyjną.

2. Przygotowanie homogenatów tkankowych do rozdziału elektroforetycznego

2.1. Przygotowanie homogenatów w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5:

Odważyć 500 mg tkanki, np. wątroby, nerki lub błony śluzowej żołądka, i dodać 4,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 5,5. Tkanke zhomogenizować homogenizatorem nożowym przez 2 minuty. Następnie homogenat odwirować przy 10.000 × g w ciągu 30 minut (12.000 obrotów/minutę, wirówka *Unipan* typ 310) i do rozdziału elektroforetycznego zachować płyn nadosadowy.

2.2. Przygotowanie homogenatów w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,0:

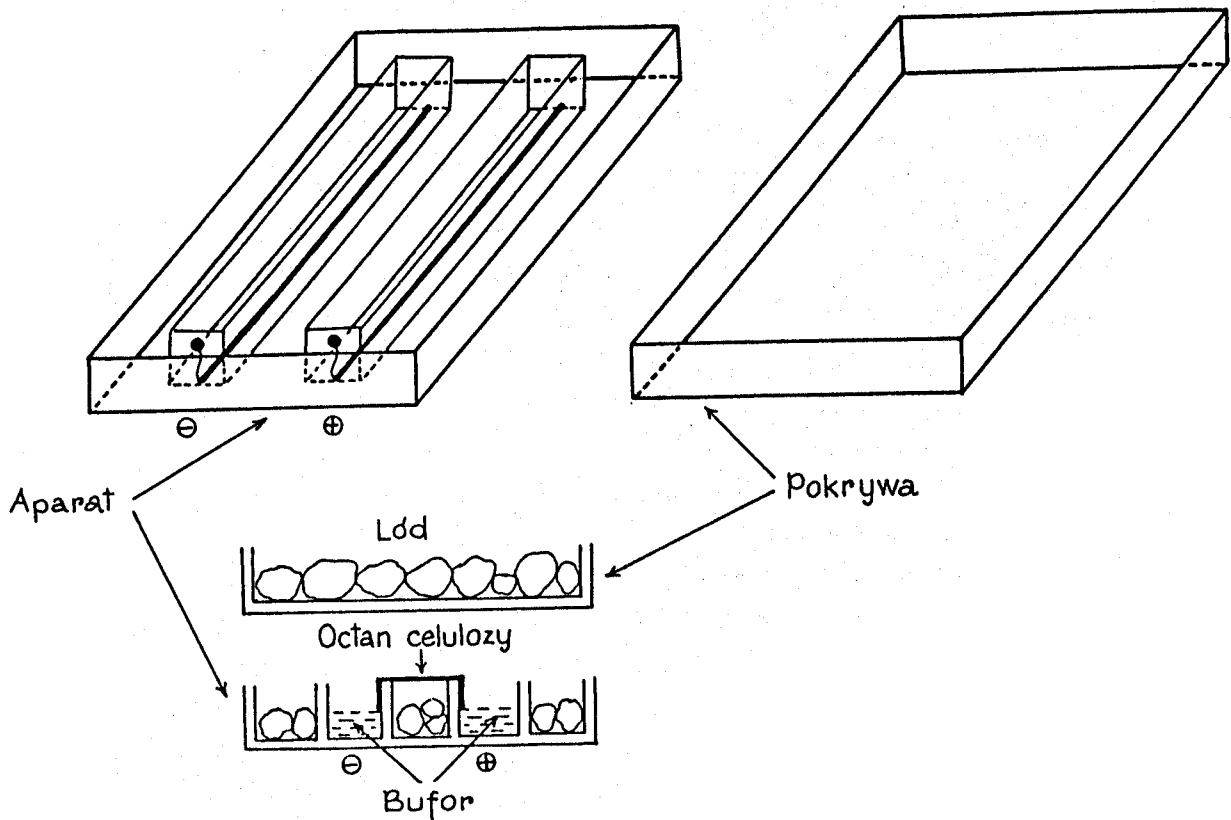
Odważyć 500 mg tkanki i dodać 4,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 5,0. Tkanke zhomogenizować homogenizatorem nożowym. Następnie homogenat odwirować przy 10.000 × g przez 30 minut (12.000 obrotów/minutę, wirówka *Unipan* typ 310) i płyn nadosadowy preinkubować w łaźni o temperaturze 60°C przez 5 minut.

2.3. Przygotowanie homogenatów w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 2,8:

Odważyć 500 mg tkanki i dodać 4,5 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 2,8. Tkanke zhomogenizować homogenizatorem nożowym. Następnie homogenat odwirować przy 10.000 × g przez 30 minut (12.000 obrotów/minutę, wirówka *Unipan* typ 310) i płyn nadosadowy preinkubować w łaźni o temperaturze 37°C przez 5 minut.

3. Rozdział elektroforetyczny

Rozdział przeprowadzić w aparacie do elektroforezy poziomej (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat aparatu do elektroforezy białek na octanie celulozy.

Po starannym umyciu aparatu napełnić kawałkami lodu dolną i górną jego część. Następnie napełnić 50 mM buforem fosforanowym o pH 6,0 komory elektrodowe dolnej części aparatu. Zawiesić 4 paski z octanu celulozy tak, aby oba brzegi każdego paska były umieszczone w komorach wypełnionych 50 mM buforem fosforanowym o pH 6,0. Przeprowadzić preelektroforezę od katody (–) do anody (+) przy natężeniu prądu 20 mA przez ok. 5 minut. Nanieść odwirowane homogenaty, przygotowane w buforach o pH 5,5; 5,0 i 2,8, każdy na oddzielny pasek octanu celulozy przy pomocy szkiełka podstawowego lub mikropipety w ilości 5 μ l w miejscu uprzednio narysowanej linii startowej. Właściwą elektroforezę prowadzić przez 2 godziny przy napięciu 200 V i natężeniu prądu 20 mA.

Po zakończonej elektroforezie należy wyłączyć zasilacz aparatu do elektroforezy, a z paskami z octanu celulozy zawierającymi elektroforogramy należy postąpić jak opisano poniżej.

Z aparatu do elektroforezy wodę z roztopionego lodu i bufor fosforanowy należy wylać do zlewu, a aparat starannie umyć.

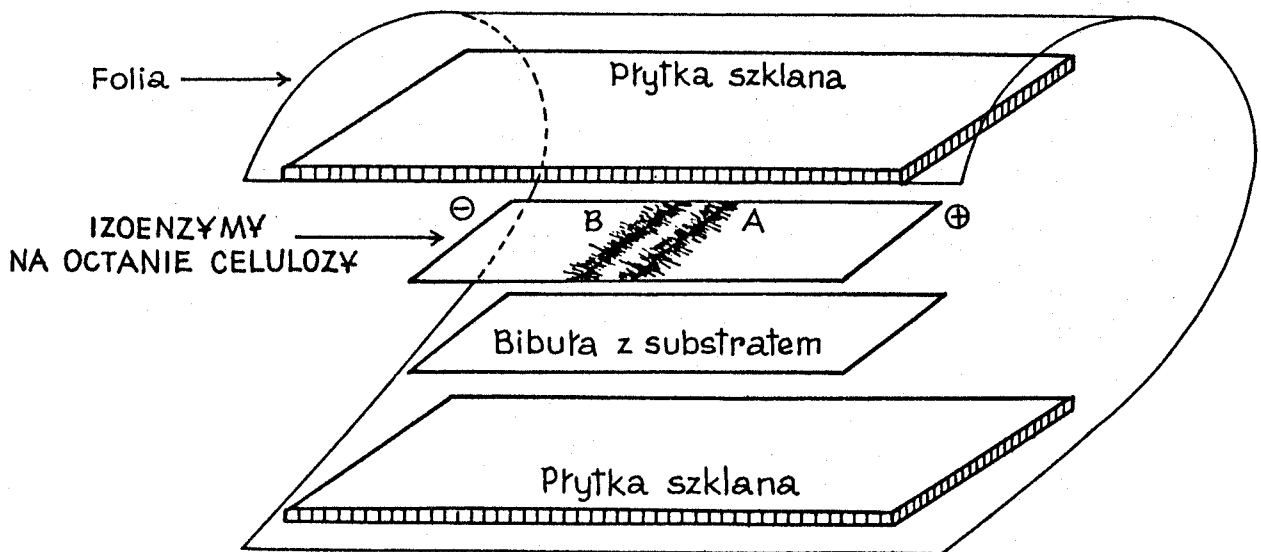
4. Wykrywanie izoenzymów

4.1. Sporządzanie substratu I:

Substrat I przygotować bezpośrednio przed użyciem.

2 mg 4-metylo-umbeliferylo-N-acetylo- β -glukoaminidu (substrat I) rozpuścić w 10 ml buforu fosforanowo-cytrynianowego w/g Mc Ilvaine o pH 4,0.

4.2. Przeprowadzenie reakcji barwnej N-acetylo- β -heksozoaminidazy na elektroforogramach:



Ryc. 2. Sposób wywoływania izoenzymów N-acetylo- β -heksozoaminidazy A i B po elektroforezie na paskach octanu celulozy.

Na płytce szklanej (ryc. 2) umieścić paski z bibuły filtracyjnej *Whatman 1* i nasączyć je przygotowanym bezpośrednio przed użyciem roztworem substratu I (4-metylo-umbeliferylo-N-acetylo- β -glukozaminidu w buforze fosforanowo-cytrynianowym w/g Mc Ilvaine o pH 4,0). Paski octanu celulozy z materiałem badanym po elektroforezie ułożyć na paskach bibuły nasączonej substratem i przykryć drugą płytą szklaną, zawinąć w wilgotną ligninę i folię i umieścić w cieplarni o temperaturze 37°C na ok. 30 minut.

Wyniki odczytać umieszczając płytkę szklaną z elektroforogramami pod lampą ultrafioletową.

5. Przechowywanie pasków z octanu celulozy

Po odczytaniu wyników, paski z octanu celulozy przemyć dwukrotnie wodą destylowaną i umieścić w naczyniu wypełnionym 30% metanolem.

6. Oznaczanie aktywności N-acetylo- β -heksozoaminidazy

Do 8 probówek oznaczonych 0, 0; 1, 1; 2, 2; 3, 3; odmierzyć po 150 μ l substratu II (p-nitrofenylo-2-acetamido-2-deoksy- β -D-glukopiranozydu w buforze fosforanowo-cytrynianowym w/g Mc Ilvaine o pH 4,7). Następnie do probówek „0” dodać po 250 μ l buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7. Do pozostałych probówek dodać po 200 μ l buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 oraz po 50 μ l wyciągu enzymatycznego, odpowiednio: do probówek 1 i 1 wyciąg sporządzony w/g przepisu w punkcie 2.1., do probówek 2 i 2 w/g pkt. 2.2. oraz do probówek 3 i 3 w/g pkt. 2.3. Wyciąg enzymatyczny należy przed dodaniem do mieszanin inkubacyjnych rozcieńczyć buforem fosforanowo-cytrynianowym o pH 4,7 w sposób podany w tabeli IV ćwiczenia 3:

- a) płyn nadosadowy homogenatu błony śluzowej żołądka 40 \times ,
- b) płyn nadosadowy homogenatu wątroby 100 \times ,
- c) płyn nadosadowy homogenatu nerki 200 \times .

Zawartość probówek wymieszać i inkubować przez 30 minut w łaźni o temperaturze 37°C. Po tym czasie próby wyjąć z łaźni, oziębic i dodać do nich po 1 ml 200 mM buforu boranowego o pH 9,8. Używając spektrofotometru odczytać ekstynkcje przy długości fali 410 nm i porównać ich wartości w próbach oznaczonych 1, 2 i 3.

Tabela I.

Nr próby	Rodzaj próby	Wartość E_{410}		Liczba i jakość prążków po elektroforezie na octanie celulozy
			Śr.	
1	Płyn nadosadowy w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,5			
1				
2	Płyn nadosadowy w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,0 po inkubacji w 60°C przez 5 minut			
2				
3	Płyn nadosadowy w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 2,8 po inkubacji w 37°C przez 5 minut			
3				

7. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 6

Temat: Transaminacja

Podstawy teoretyczne

1. Wzory α -L-aminokwasów,
2. Metody wykrywania i oznaczania aminokwasów.
3. Reakcja aminokwasów z ninhydryną.
4. Chromatografia bibułowa aminokwasów.
5. Współczynnik R_F .
6. Biosynteza i katabolizm aminokwasów.
7. Przebieg reakcji katalizowanej przez aminotransferazę alaninową (ALAT).

Literatura

1. Kański M., (1957): Chromatografia aminokwasów., w: Chromatografia, red. Opieńska-Blauth J., Waksmundzki A., Kański M., PWN, Warszawa, s. 427-491.
2. Jaroszewicz L. i wsp., (1969): Aminotransferases in cases of gastric ulcers., Digestion, nr 2, s. 323-328.
3. Harper H.A. i wsp., (1983): Zarys chemii fizjologicznej, PZWL, Warszawa, s. 23-36, 105-106, 229-237, 538-614.
4. Stryer L., (1986): Biochemia, PWN, Warszawa, s. 33-40, 438-461, 505-507.
5. Filipowicz B., Więckowski W., (1986): Biochemia, PWN, Warszawa-Łódź, t. II, s. 142-155, 434-438.
6. Filipowicz B., Więckowski W., (1990): Biochemia, PWN, Warszawa-Łódź, t. I, s. 142-155, 434-438.

Cel ćwiczenia

Wykazanie reakcji transaminacji na przykładzie katalitycznego działania transaminazy alaninowej (ALAT) otrzymanej z mięśnia sercowego.

Odczynniki

- 1) 0,2 M alanina o pH 8,0,
- 2) 0,2 M kwas glutaminowy o pH 8,0,
- 3) 0,2 M kwas α -ketoglutarynowy o pH 8,0,
- 4) 0,5 M fosforan disodowy - Na_2HPO_4 o pH 8,3,
- 5) aminotransferaza otrzymana z mięśnia sercowego świni,
- 6) 4 mM EDTA w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,5,
- 7) amoniak stężony,

- 8) mieszanina rozpuszczalników: etanol - butanol III rzędowy - amoniak - woda (60 : 20 : 5 : 15),
9) odczynnik ninhydrynowy.

Wykonanie

1. Otrzymywanie aminotransferazy alaninowej

Serce powinno być zamrożone przez kilka tygodni. Po rozmrożeniu serce pokroić, oczyścić z tłuszczu i odważyć 2 g. Następnie do 2 g tkanki dodać 8 ml roztworu 4 mM EDTA w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,5 i zhomogenizować homogenizatorem nożowym. Homogenat odwirować przy $1000 \times g$ przez 10 minut. Do dalszych doświadczeń zachować płyn nadosadowy, w którym znajduje się enzym - aminotransferaza alaninowa (AlAT).

2. Sporządzanie mieszanin inkubacyjnych

2.1. Sporządzanie próby kontrolnej

Do probówki odmierzyć 0,2 ml 0,5 M fosforanu disodowego - Na_2HPO_4 o pH 8,3; 0,3 ml roztworu alaniny; 0,1 ml roztworu kwasu α -ketoglutazarowego i 1,5 ml płynu nadosadowego zawierającego aminotransferazę alaninową. Zawartość probówki zamieszać i umieścić natychmiast we wrzącej łaźni wodnej na 10 minut. Po inaktywacji enzymu zawartość probówki przesączyć.

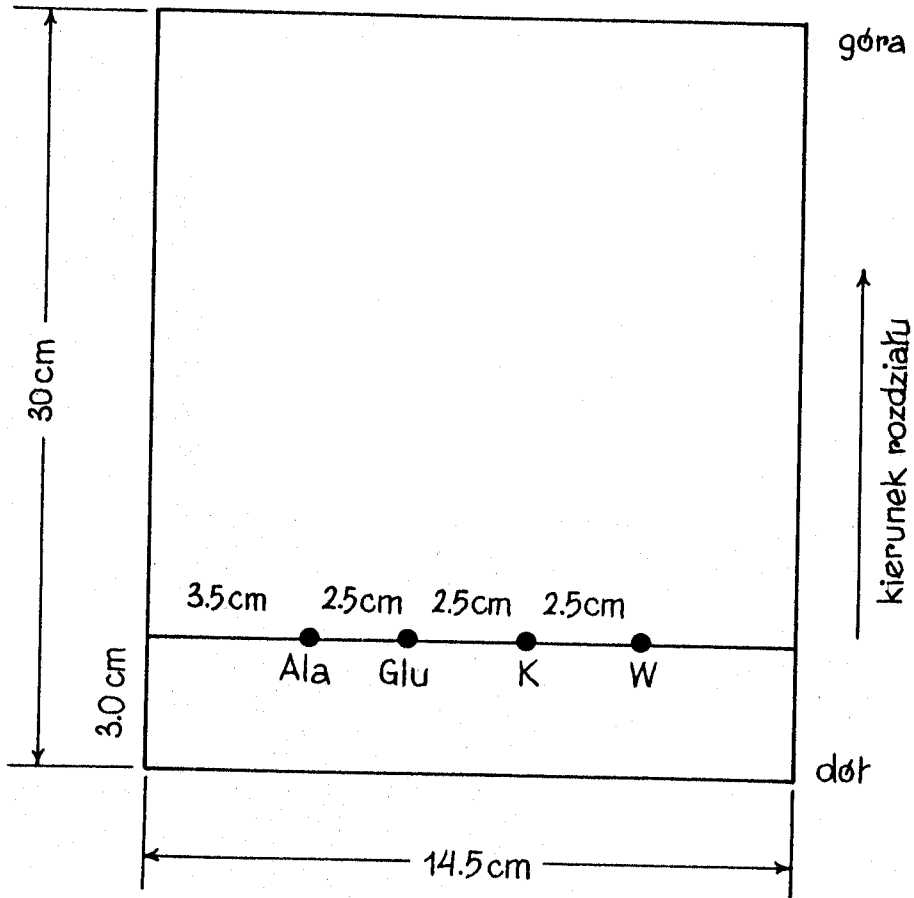
2.2. Sporządzanie próby właściwej

Do probówki odmierzyć 0,2 ml 0,5 M roztworu Na_2HPO_4 o pH 8,3; 0,3 ml roztworu alaniny; 0,1 ml roztworu kwasu α -ketoglutazarowego i 1,5 ml płynu nadosadowego zawierającego aminotransferazę alaninową. Zawartość probówki zamieszać i umieścić natychmiast w łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 2 godziny. Po inkubacji zawartość probówki zagotować i przesączyć.

3. Chromatografia

3.1. Przygotowanie bibuły

Na bibule *Whatman 1* (ryc. 1.) o wymiarach $14,5 \times 30$ cm w odległości 3 cm od dolnego brzegu (jeden z krótkich brzegów) narysować zwykłym ołówkiem linię startu. Na tej linii zaznaczyć zwykłym ołówkiem pierwszy punkt w odległości 3,5 cm od lewego brzegu, a następnie trzy pozostałe w odległościach co 2,5 cm. Punkty te opisać kolejno od lewej, pisząc pod nimi zwykłym ołówkiem symbole: **Ala** (miejsce naniesienia na bibułę alaniny), **Glu** (miejsce naniesienia na bibułę kwasu glutaminowego), **K** (miejsce naniesienia na bibułę próby kontrolnej) oraz **W** (miejsce naniesienia na bibułę próby właściwej).



Ryc.1. Przygotowanie bibuły do chromatografii (opis w punkcie 3.1.)

3.2. Przygotowanie komory amoniakalnej

Do szklanej komory wlać pod wyciągiem stężonego amoniaku ($h = 0,5$ cm) i przykryć szczelnie płytą szklaną.

3.3. Przygotowanie komory chromatograficznej

Do szklanej komory wlać mieszaniny rozpuszczalników (solwent): etanol - butanol III rzędowy - amoniak - woda (60 : 20 : 5 : 15) ($h = 1$ cm), tj. w takiej ilości, aby dolny brzeg zawieszony bibuły mógł być zanurzony 0,5 cm w tej mieszaninie. Komorę szczelnie przykryć płytą szklaną.

3.4. Nanoszenie próbek na bibułę chromatograficzną

3.4.1. Nanoszenie próbki alaniny

Na punkt zaznaczony na bibule jako *Ala* nanieść szklaną kapilarą 1 kroplę roztworu alaniny i wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza dmuchawy elektrycznej.

3.4.2. Nanoszenie próbki kwasu glutaminowego

Na punkt zaznaczony na bibule jako **Glu** nanieść szklaną kapilarą 1 kroplę roztworu **kwasu glutaminowego** i wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza dmuchawy elektrycznej.

3.4.3. Nanoszenie próby kontrolnej

Na punkt zaznaczony na bibule jako **K** nanieść szklaną kapilarą 1 kroplę roztworu **próby kontrolnej** i wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza dmuchawy elektrycznej. Po wysuszeniu, w to samo miejsce nanieść jeszcze 1 kroplę roztworu próby kontrolnej i wysuszyć ponownie w strumieniu ciepłego powietrza dmuchawy elektrycznej.

3.4.4. Nanoszenie próby właściwej

Na punkt zaznaczony na bibule jako **W** nanieść szklaną kapilarą 1 kroplę roztworu **próby właściwej** i wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza dmuchawy elektrycznej. Po wysuszeniu, w to samo miejsce nanieść jeszcze 1 kroplę roztworu próby właściwej i wysuszyć ponownie w strumieniu ciepłego powietrza dmuchawy elektrycznej.

3.5. Właściwa chromatografia

3.5.1. Neutralizacja wolnych aminokwasów i kwaśnych soli

Po naniesieniu prób i wysuszeniu bibulę zawiesić w komorze amoniakalnej na 30 minut, aby zneutralizować wolne aminokwasy i kwaśne sole.

3.5.2. Rozwijanie chromatogramów

Z komory amoniakalnej bibulę przenieść do komory z mieszaniną rozpuszczalników (solwent): etanol - butanol III rz. - amoniak - woda (60 : 20 : 5 : 15) i zawiesić tak, aby dolny jej brzeg był zanurzony w solwencie na głębokość 0,5 cm. Chromatogram rozwijać, aż czoło solwentu przejdzie około 20 cm od linii startu i wyjąć z komory.

3.5.3. Suszenie chromatogramów

Wyjęty z komory chromatogram suszyć: najpierw na powietrzu, a potem w cieplarni o temperaturze 90°C przez 5 minut.

3.6. Wywoływanie chromatogramów

Wysuszony chromatogram spryskać odczynnikiem ninhydrynowym i ponownie ogrzać w cieplarni o temperaturze 90°C przez 3 minuty. Zaobserwować pojawianie się barwnych plam aminokwasów na chromatogramie.

4. Współczynnik R_f

Na podstawie obliczonych współczynników R_f dla poszczególnych plam zidentyfikować rozdzielone aminokwasy.

$$R_f = \frac{\text{odległość plamy aminokwasu od linii startu}}{\text{odległość czoła solwentu od linii startu}}$$

5. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 7

Temat: Białka komórkowe i białka osocza krwi. Analiza elektroforetyczna białek frakcji cytoplazmatyczno-mikrosomalnej i białek osocza w żelu poliakrylamidowym

Podstawy teoretyczne

1. Białka jako elektrolity.
2. Białka osocza krwi (skład i rola biologiczna).
3. Białka komórkowe (skład i rola biologiczna).
4. Elektroforeza białek.
5. Analiza elektroforetyczna białek w żelu poliakrylamidowym.

Literatura

1. Ostrowski W., (1970): Elektroforeza w badaniach biochemicznych i klinicznych, PWN, Warszawa, s. 189-199.
2. Sznajd J. (red.), (1983): Biochemia kliniczna w praktyce lekarskiej, PZWL, Warszawa, s. 109-128, 673-674, 696-719, 776-777, 1034-1035.
3. Pawelski S., Maj S., (1987): Normy i kliniczna interpretacja badań diagnostycznych w medycynie wewnętrznej, PZWL, Warszawa, s. 18-49.
4. Filipowicz B., Więckowski W., (1990): Biochemia, PWN, Warszawa-Łódź, t. I, s. 189-191.
5. Angielski S., (1990): Biochemia kliniczna i analityczna, PZWL, Warszawa, s. 17, 30, 336-347, 532-541.
6. Hames B.D., (1990): One-dimensional Polyacrylamide gel electrophoresis., w: Gel electrophoresis of proteins, red. Hames B.D., Rickwood D., Oxford University Press, New York, s. 1-147.
7. Bollag D.M., (1991): Gel electrophoresis under denaturing conditions., w: Protein methods, red. Bollag D.M., Edelsteien S.J., Wiley-Liss, Inc., New York, s. 95-142.

Cel ćwiczenia

1. Wykonanie elektroforezy białek frakcji cytoplazmatyczno-mikrosomalnej i białek osocza w żelu poliakrylamidowym.
2. Analiza obrazów elektroforetycznych białek frakcji cytoplazmatyczno-mikrosomalnej i białek osocza po rozdziale w żelu poliakrylamidowym.

Odczynniki

- 1) 1,5 M bufor TRIS (2-amino-2-hydroksymetyl-1,3-propandiol)-HCl o pH 8,8;
- 2) 0,5 M bufor TRIS-HCl o pH 6,8;

- 3) roztwór akrylamidów (30% akrylamidu i 2,7% bis-akrylamidu (N,N'-metyleno-bis-akrylamid));
- 5) TEMED (1,2-bis-dimetylaminoetan);
- 6) 10% nadsiarazan amonu;
- 7) 10% SDS (siarczan dodecylanu sodu);
- 8) glicerol;
- 9) glicyna;
- 10) EDTA (wersenian dwusodowy);
- 11) 2-merkptoetanol;
- 12) 0,04% błękit bromofenolowy;
- 13) Coomassie Brilliant Blue;
- 14) kwas octowy;
- 15) etanol;
- 16) nasycony wodny roztwór N-butanolu

Wykonanie

1. Przygotowanie próbek do elektroforezy

1.1. Bufor lizujący:

W celu przygotowania buforu lizującego należy zmieszać:

- 1) 0,5 ml buforu TRIS-HCl o pH 6,8,
- 2) 2 ml 10% SDS,
- 3) 1 ml glicerolu,
- 4) 0,5 ml merkptoetanolu,
- 5) 0,2 ml 0,04% błękitu bromofenolowego,
- 6) 1,3 ml wody.

1.2. Przygotowanie tkanki:

Odważyć 0,5 g tkanki, umieścić ją w zlewce i dodać 4,5 ml 154 mM KCl. Zhomogenizować homogenizatorem nożowym przez 1 minutę. Homogenat przenieść do probówki wirówkowej i wirować przy $10.000 \times g$ przez 10 minut w wirówce *Unipan* typ 310. Następnie do probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 ml wlać 100 μ l płynu nadosadowego i dodać równą objętość buforu lizującego (patrz pkt. 1.1.), probówki zamknąć i umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 5 minut, a następnie oziębic.

1.3. Przygotowanie surowicy:

Do probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 ml wlać 100 μ l surowicy i równą objętość buforu lizującego (patrz pkt. 1.1.), probówkę zamknąć, wymieszać zawartość i umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 5 minut, a następnie oziębic.

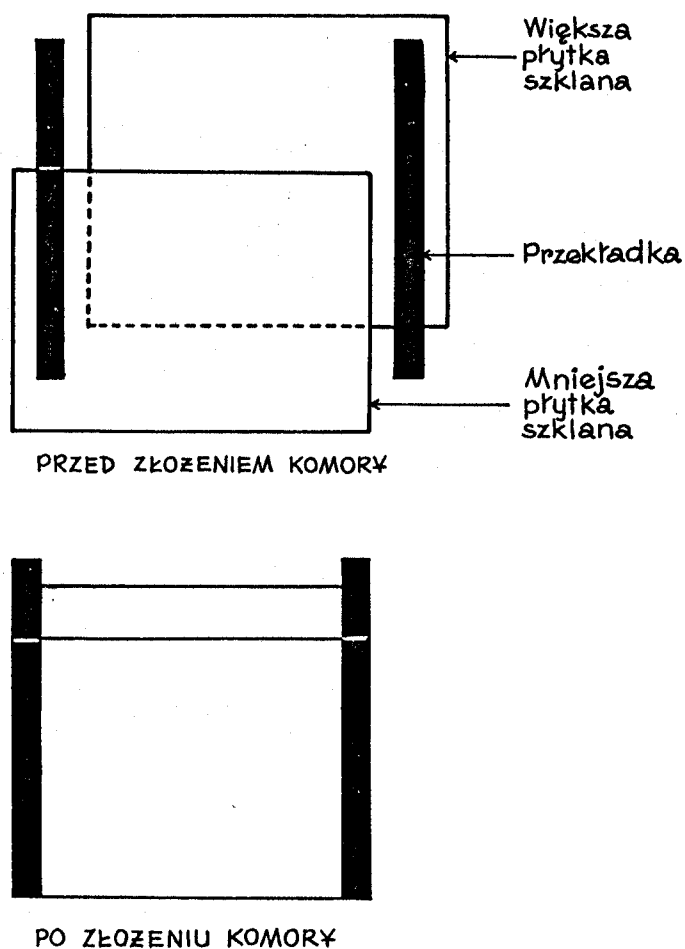
2. Przygotowanie płyty żelowej

2.1. Mycie płytek szklanych:

Płyty szklane należy dokładnie umyć w detergencie, umieścić na dobę w mieszaninie chromowej i wypłukać najpierw w wodzie wodociągowej, a następnie w wodzie destylowanej i wysuszyć w suszarce.

2.2. Zestawienie komory:

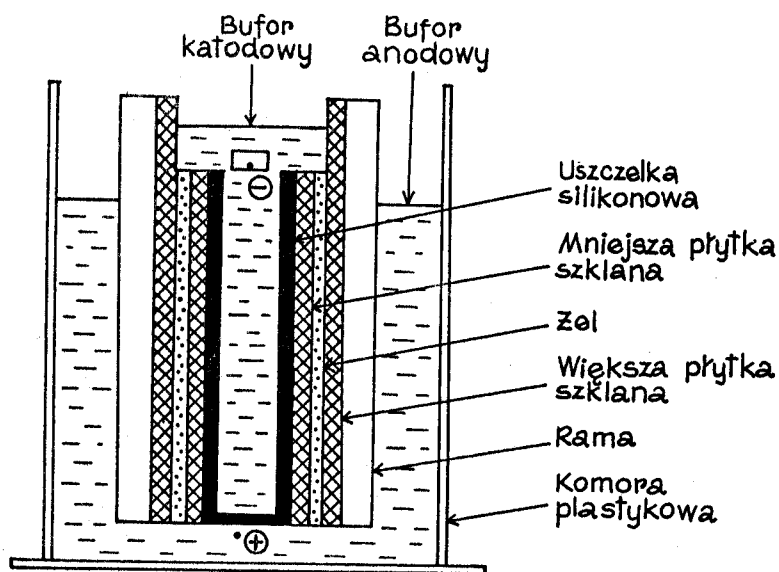
Wysuszone płytki szklane należy złożyć w/g schematu (ryc. 1).



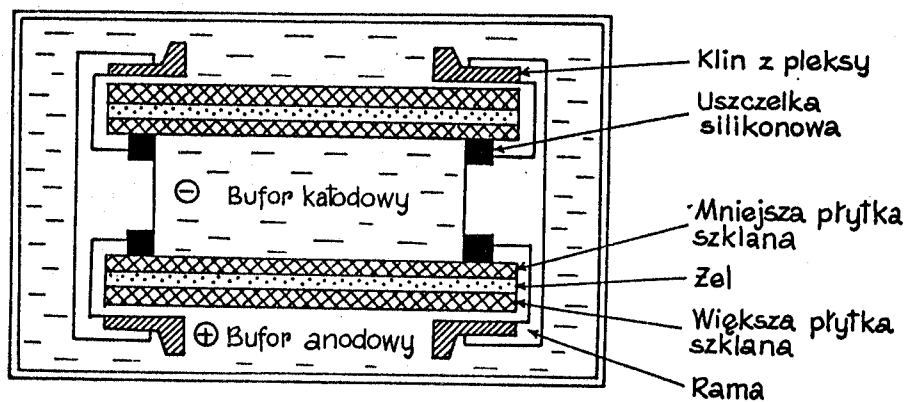
Ryc. 1. Składanie elementów komory, w której polimeryzuje się płytę żelową.

Większą płytkę szklaną ułożyć na stole, następnie wzdłuż krótszych boków położyć przekładki, uprzednio posmarowane delikatnie smarem silikonowym. Położyć mniejszą płytkę szklaną. Między płytkami i przekładkami powstaje wolna przestrzeń.

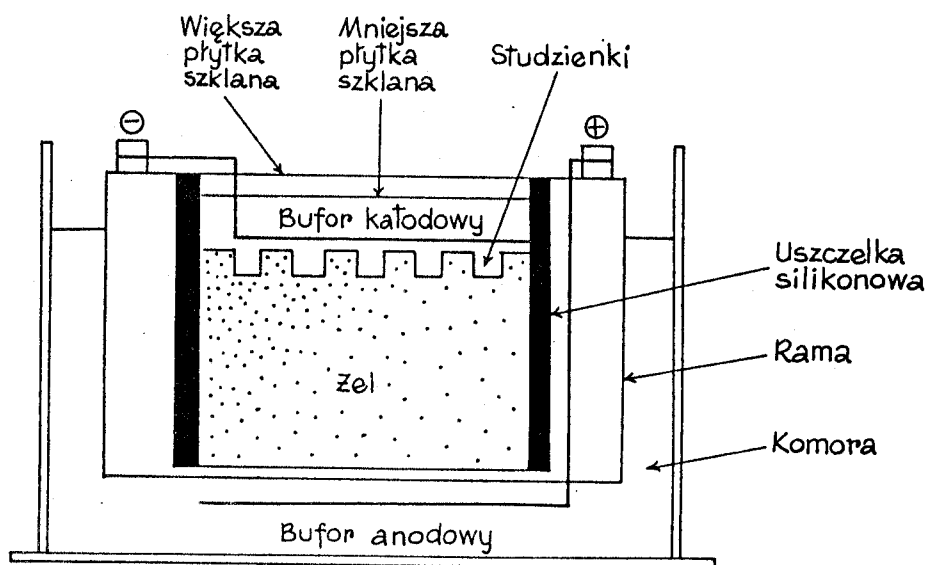
Tak przygotowaną komorę umieścić w aparacie do elektroforezy (ryc. 2) i umocować przy pomocy klinów.



Ryc.1.1 WIDOK Z BOKU



Ryc.1.2 WIDOK Z GÓRY



Ryc.1.3 WIDOK Z PRZODU

Ryc. 2. Schemat aparatu do elektroforezy białek na żelu poliakrylamidowym.

3. Żel rozdzielający (żel dolny)

3.1. Odczynniki:

- 1) 6,7 ml wody
- 2) 5 ml 1,5 M buforu TRIS-HCl o pH 8,8,
- 3) 8 ml roztworu akrylamidów.
- 4) 0,2 ml 10% SDS,

Katalizatory:

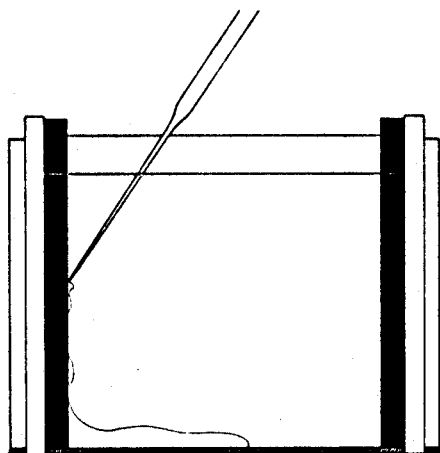
- 5) 0,1 ml 10% nadsiarczanu amonu,
- 6) 10 μ l TEMED-u.

3.2. Przygotowanie żelu rozdzielającego:

W małej kolbce przygotować żel rozdzielający biorąc odczynniki wymienione w pkt 3.1. i w wymienionych tam objętościach, ale **nie dodawać katalizatorów**.

3.2.1. Żel korkujący:

Do probówki na 10 ml odlać 2 ml przygotowanego j/w roztworu i dodać po 5 μ l każdego z katalizatorów, **błyskawicznie wymieszać** i pipetą wlać 1 ml roztworu po jednej przekładce między szklane płytki komory (ryc. 3). Na dnie powinna utworzyć się cienka warstwa akrylamidów. Po ok. 10 minutach akrylamidy powinny spolimeryzować.



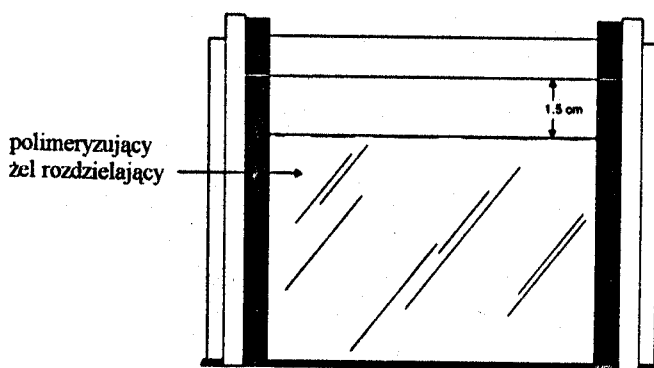
Ryc. 3. Wprowadzanie do komory roztworu żelu korkującego (w następnej kolejności podobnie wprowadza się żel rozdzielający).

3.2.1. Żel rozdzielający:

Po upewnieniu się, że żel korkujący spolimeryzował (nie jest już płynny) do reszty wcześniej przygotowanego żelu rozdzielającego dodać katalizatorów w ilościach podanych w pkt. 3.1., błyskawicznie wymieszać i wlać go pomiędzy płytki komory (ryc. 3). Odległość pomiędzy górną krawędzią mniejszej szyby a poziomem żelu powinna wynosić 1,5 cm (ryc. 4).

Na powierzchnię wylanego żelu delikatnie nawarstwić pipetą 0,5 ml dolnej fazy nasyconego roztworu butanolu.

Polimeryzacja żelu trwa 30 minut.



Ryc. 4. Polimeryzacja żelu rozdzielającego.

4. Przygotowanie żelu zagęszczającego (żel górny)

Po spolimeryzowaniu żelu rozdzielającego (żel dolny) zlać roztwór nawarstwiający, przepłukać powierzchnię żelu 2 razy wodą redest. i osuszyć bibułą.

4.1. Odczynniki:

W kolbce przygotować stale mieszając żel zagęszczający o składzie:

- 1) 2,5 ml 0,125 M buforu Tris-HCl o pH 6,8,
- 2) 6,1 ml wody
- 3) 1,3 ml roztworu akrylamidów,
- 4) 0,1 ml 10% SDS,

Katalizatory:

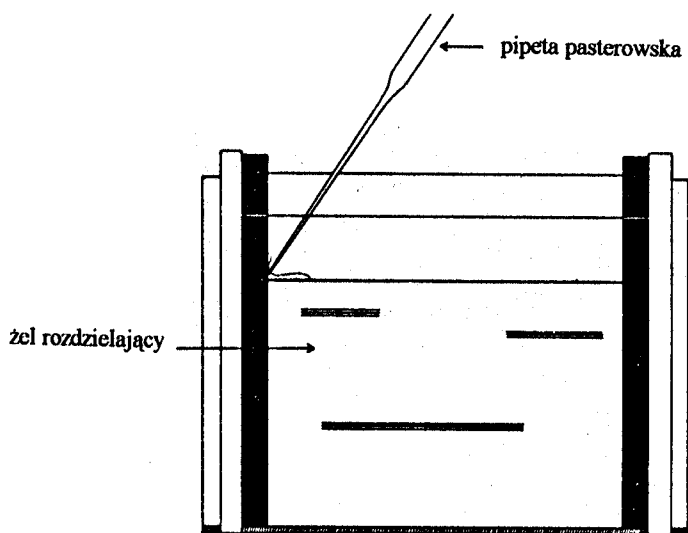
- 5) 50 μ l 10% nadsiarczanu amonu,
- 6) 10 μ l TEMED-u.

4.2. Żel zagęszczający:

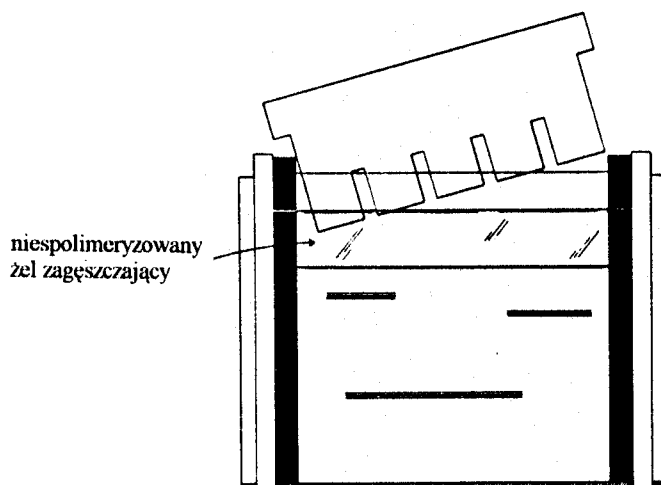
Wymieszać błyskawicznie roztwory przygotowane w/g pkt. 4.1. i wlać między płyty komory (ryc. 5).

Następnie do górnego żelu wsunąć grzebień (zębami do dołu) (ryc. 6). Należy uważać aby nie wepchnąć pęcherzyków powietrza pod zęby grzebienia.

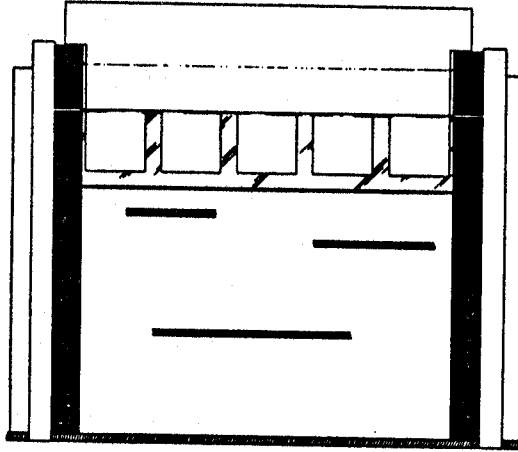
Polimeryzacja żelu górnego (ryc. 7) trwa 30 minut.



Ryc. 5. Wprowadzanie roztworu żelu zagęszczającego do komory.



Ryc. 6. Wprowadzanie grzebienia do roztworu żelu zagęszczającego.



Ryc. 7. Polimeryzacja żelu zagęszczającego.

5. Przeprowadzenie rozdzału elektroforetycznego

5.1. Bufor elektrodowy o pH 8,3:

- 1) 6 g TRIS-u,
- 2) 28,8 g glicyny,
- 3) 1 g SDS,
- 4) 1,87 g EDTA,
- 5) woda do 1000 ml.

5.2. Przygotowanie aparatu do elektroforezy

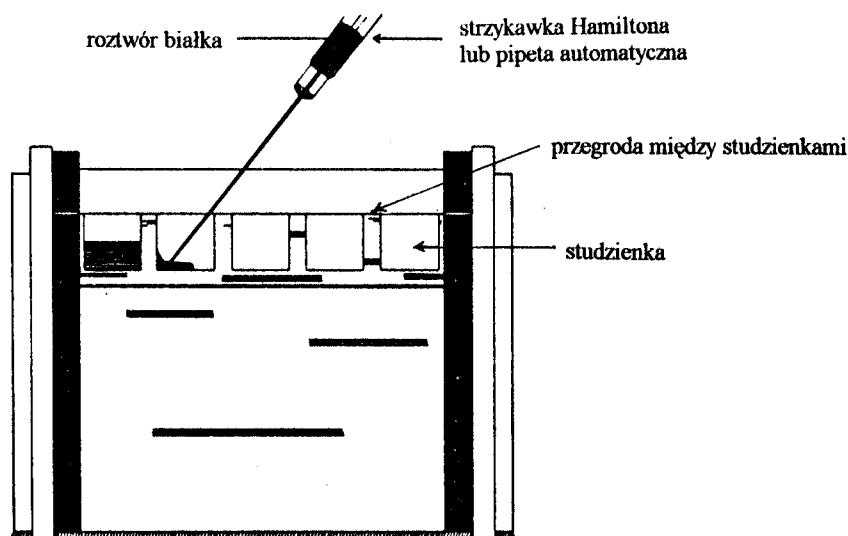
Ostrożnie wysunąć z komory grzebień (w żelu zagęszczającym powstały studzienki) (ryc. 8).

Komorę szklaną zawierającą żele wstawić pionowo wraz z aparatem do pojemnika (ryc. 2) i wlać bufor elektrodowy (w/g pkt. 5.1.) do górnego i dolnego pojemnika, tak aby bufor w górnym zbiorniku przykrywał warstwą 1 cm studzienki w żelu.

5.3. Elektroforeza:

5.3.1. Nanoszenie próbek do studzienek:

Używając strzykawki Hamiltona lub pipety automatycznej z cienkim „tipsem” ostrożnie nanieść do studzienek po 10 μ l przygotowanych próbek (ryc. 8).



Ryc. 8. Wprowadzanie roztworu białka do studzienek w żelu zagęszczającym.

5.3.2. Elektroforeza wstępna:

Po naniesieniu próbek aparat przykryć pokrywą.

Przy pomocy kabli połączyć aparat do elektroforezy z zasilaczem (ryc. 2), tak aby prąd płynął w kierunku od katody (–) (górna elektroda) do anody (+) (dolna elektroda). Natychmiast włączyć zasilacz prądu i ustawić prąd o wartości 30 mA (80-100 V).

5.3.3. Elektroforeza właściwa:

Po wnikięciu barwnika w dolny (rozdzielający) żel zwiększyć przepływ prądu do wartości 40-45 mA (ok. 150 V) dla żelu grubości 1,5 mm. Elektroforeza trwa ok. 2 godzin.

5.3.4. Zakończenie elektroforezy:

Po dojściu czoła barwnika na odległość ok. 0,5 cm od dolnego końca żelu wyłączyć zasilacz, odłączyć od aparatu przewody doprowadzające prąd i wyjąć środkową część aparatu z żelami. Następnie z aparatu wyjąć szyby z żelem i ułożyć je na stole. Żel wyjąć ostrożnie spomiędzy szklanych płyt (należy pracować w gumowych rękawicach).

6. Barwienie żelu

Umieścić żele w kuwecie z roztworem barwiącym o składzie:

- 1) 500 mg% Coomassie Brilliant Blue,
- 2) 400 ml kwasu octowego,
- 3) 100 ml etanolu,

4) woda do 1000 ml,
i barwić przez 1 godzinę w temperaturze laboratoryjnej delikatnie mieszając, lub zostawić do następnego dnia bez mieszania.

7. Odbarwianie żelu

Żel wyjąć ostrożnie z barwnika, wypłukać w wodzie i umieścić w kuwecie z odbarwiaczem o składzie:

- 1) 400 ml lodowatego kwasu octowego,
- 2) 100 ml etanolu,
- 3) woda do 1000 ml,

i przez 10 minut delikatnie mieszać. Następnie zmieniać odbarwiacz na nowy o składzie:

- 1) 100 ml lodowatego kwasu octowego,
- 2) 100 ml etanolu,
- 3) woda do 1000 ml,

i zmieniać go co 10 minut, stale mieszając, aż do uzyskania bezbarwnego tła.

8. Prześwietlanie żelu

Po uzyskaniu bezbarwnego tła żel umieścić w kuwecie z 6% wodnym roztworem kwasu octowego na czas od 1 do kilku godzin.

9. Analiza obrazów elektroforetycznych białek w żelu poliakrylamidowym

Na stoliku aparatu „Gel Documentation System 5000” firmy *Ultra Violet Products, Ltd, Cambridge, Anglia*, ułożyć listek przezroczystej folii, a na nim zabarwiony żel z pasmami elektroforetycznymi białek. Obserwując ekran monitora „Gel Documentation System 5000” przeanalizować skład i określić stężenie poszczególnych białek rozdzielonych przy zastosowaniu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.

10. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 8

Temat: Otrzymywanie kwasów nukleinowych z leukocytów

Podstawy teoretyczne

1. DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (budowa, występowanie, funkcja biologiczna, biosynteza i katabolizm).
2. RNA - kwas rybonukleinowy (budowa, występowanie, funkcja biologiczna, biosynteza i katabolizm).
3. Rodzaje RNA (mRNA, tRNA i rRNA).
4. Metody otrzymywania i badania struktury kwasów nukleinowych.

Literatura

1. Harper H.A. i wsp., (1983): Zarys chemii fizjologicznej, PZWL, Warszawa, s. 175-200, 615-670.
2. Stryer L., (1986): Biochemia, PWN, Warszawa, s. 528-552, 580-778.
3. Beardley T., (1991): Sprytne geny., Świat Nauki, nr 2, s. 70-80.
4. Erickson D., (1992): Rozszyfrowywanie ludzkiego genomu., Świat Nauki, nr 6 (10), s. 82-90.
5. Barciszewska M.Z., Barciszewski J., (1992): Zależność funkcji kwasów nukleinowych od struktury., Postępy Biochemii, t. 38, nr 4, s. 171-178.
6. Olson A.J., Goodsell D.S., (1993): Obrazy cząstek biologicznych., Świat Nauki, nr 1 (17), s. 44-50.

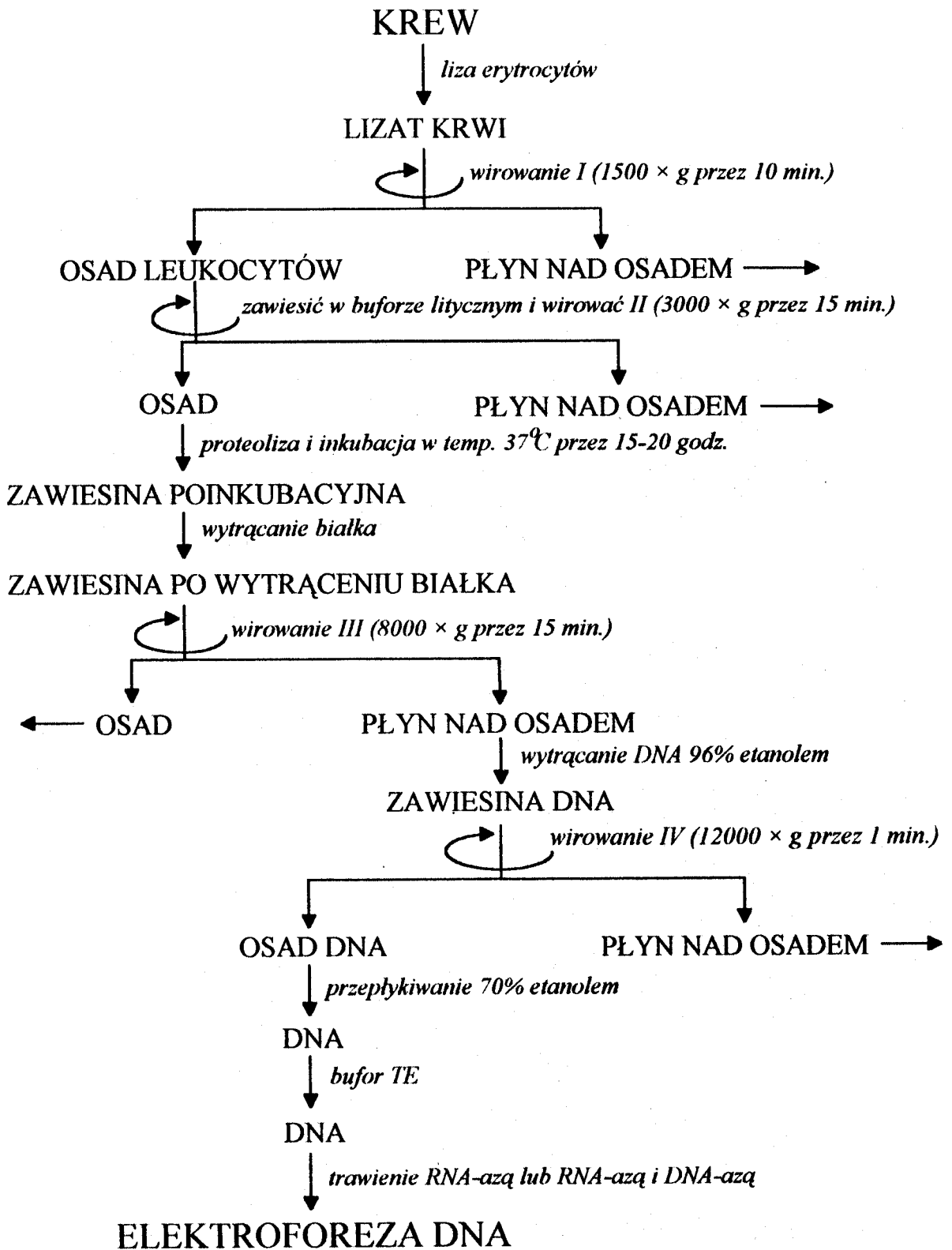
Cel ćwiczenia

Wyizolowanie DNA leukocytów krwi ludzkiej.

Odczynniki

- 1) mieszanina lityczna (4,146 g NH_4Cl ; 0,5 g KHCO_3 ; 2 ml 0,05 M EDTA; uzupełnić wodą do 300 ml),
- 2) bufor SE (1,9 ml 4 M NaCl; 4,8 ml 0,05 M EDTA; uzupełnić wodą do 100 ml),
- 3) 20% siarczan dodecylanu sodu (SDS),
- 4) pronaza: 20 mg rozpuścić w 1 ml wody i pozostawić przez 2 godziny w cieplarni w temperaturze 37°C ; przechowywać w temperaturze -20°C ,
- 5) nasycony roztwór NaCl,
- 6) 96% etanol,
- 7) 70% etanol,
- 8) bufor TE (121 mg Tris-HCl; 18,6 mg EDTA o pH 7,4; uzupełnić wodą do 100 ml).

Wykonanie



Ryc. 1. Schemat otrzymywania DNA z leukocytów krwi ludzkiej.

UWAGA!

Używany w tym ćwiczeniu materiał biologiczny (krew ludzka) może być zainfekowany HIV wywołującym AIDS i WZW wywołującym żółtaczkę zakaźną. Ćwiczenie należy wykonywać z zachowaniem szczególnych środków ostrożności.

Proces izolowania kwasów nukleinowych z leukocytów krwi (ryc. 1) trwa 2 dni.

I etap (dzień) preparatyki

1. Liza krwinek

1.1. Pierwszy etap

Do probówki *Falcon* o objętości 50 ml wlać 10 ml świeżej lub konserwowanej krwi. Następnie dodać 30 ml 5 × rozcieńczonego wodą zimnego buforu litycznego. Powstałą zawiesinę delikatnie mieszać przez odwracanie probówki przez 5 minut.

1.2. Drugi etap

Wymieszaną zawiesinę inkubować 30 minut w pojemniku z lodem. W trakcie inkubacji zawartość probówki kilkakrotnie mieszać w sposób jak poprzednio. Po inkubacji ciemnoczerwona barwa zawiesiny w probówce powinna stać się bardziej przejrzysta.

2. Wirowanie I

Zawiesinę podzielić na dwie części po 20 ml. Wirowanie przeprowadzić w wirówce typ *T-52* przy 2000 obrotów/minutę przez 10 minut w temperaturze 4°C. Do dalszej preparatyki zachować osad.

3. Wirowanie II

Osady zawiesić w 5 ml zimnego buforu litycznego i przenieść do probówek plastikowych o pojemności 8 ml i delikatnie wymieszać przez odwracanie probówki przez 5 minut. Zawiesiny wirować w wirówce *Unipan* typ *310* przy 4000 obrotów/minutę przez 15 minut w temperaturze 4°C. Płyn nadosadowy odrzucić.

Etap ten należy powtarzać, aż osad leukocytów stanie się bezbarwny.

4. Proteoliza

Osad leukocytów zawiesić w 5 ml buforu SE i przenieść ponownie do probówki *Falcon*. Następnie dodać 25 µl roztworu pronazy oraz 250 µl 20% SDS. Zawartość probówki dokładnie wymieszać.

Mieszaninę inkubować w cieplarni o temperaturze 55°C przez 15-20 godzin.

II etap (dzień) preparatyki

5. Wytrącanie białka

Do zawiesiny pookubacyjnej dodać 1,5 ml nasyconego roztworu NaCl i wymieszać na mieszadło *Vortex* przez 10 sekund.

6. Wirowanie III

Zawiesinę przenieść do probówki plastikowej o objętości 8 ml i wirować w wirówce *Unipan* typ 310 przy 10000 obrotów/minutę przez 15 minut w temperaturze laboratoryjnej.

Po odwirowaniu powinien pojawić się osad białka, a płyn nad osadem powinien być klarowny. Jeśli tak nie jest, to należy dodać jeszcze 1 ml nasyconego roztworu NaCl, wymieszać i odwirować jak poprzednio. Do dalszej preparatyki zachować płyn nadosadowy.

7. Wytrącanie DNA

Płyn nadosadowy zdekantować do szklanej kalibrowanej probówki o pojemności 15 ml i dodać dwukrotną objętość 96% etanolu. Zawartość probówki delikatnie wymieszać, aż wytrąci się DNA w postaci kłaczków. Następnie zawartość probówki delikatnie przelać do zlewki. Używając pipety automatycznej ze ściętym „tipsem” przenieść kłaczek DNA do probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 ml.

8. Wirowanie IV

Probówki Eppendorfa umieścić w wirówce *MPW 320* i wirować przez 1 minutę. Płyn nadosadowy odrzucić.

9. Przemycanie DNA

Osad DNA przemycać 2 razy 70% etanolem, a następnie etanol zlać i probówkę zostawić do odparowania jego resztek.

10. Przechowywanie otrzymanego DNA

Uzyskany DNA zawiesić w 1,5 ml buforu TE rozcieńczonego uprzednio wodą redestylowaną 10 razy. Przechowywać w chłodni o temperaturze 4°C.

11. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 9

Temat: Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Podstawy teoretyczne

1. Nukleotydy i ich funkcja biologiczna.
2. Endonukleazy restrykcyjne i ich rola w badaniach laboratoryjnych.
3. Elektroforeza DNA.

Literatura

1. Harper H.A. i wsp., (1983): Zarys chemii fizjologicznej, PZWL, Warszawa, s. 642-659.
2. Stryer L., (1986): Biochemia, PWN, Warszawa, s. 580-622.
3. Wrzesiński J., Krzyżosiak W., (1990): Nowoczesne metody sekwencjonowania DNA., Postępy Biochemii, t. 36, nr 1-2, s. 21-31.
4. Moyzis R.K., (1991): Ludzki telomer., Świat Nauki, nr 2, s. 28-36.
5. Koziółkiewicz M., (1993): Oddziaływanie restrykcyjnej endonukleazy Eco RI i DNA., Postępy Biochemii, t. 37, nr 1, s. 23-32.

Cel ćwiczenia

1. Elektroforeza DNA leukocytów krwi ludzkiej w żelu agarozowym.
2. Porównanie obrazów elektroforetycznych DNA przed i po trawieniu DNA-azą.

Odczynniki

- 1) 10 mg/ml DNA-azy w wodzie,
- 2) 10 mg/ml RNA-azy w wodzie,
- 3) barwnik obciążający (3,3 g sacharozy uzupełnić wodą do 5 ml i rozpuścić, następnie dodać 20 mg błękitu bromofenolowego),
- 4) 0,8% agaroza w buforze elektrodowym o pH 7,8,
- 5) bufor elektrodowy o pH 7,8 (54 g Tris-NaOH; 27,5 g kwasu borowego; 20 ml 0,5 M EDTA o pH 8,0; uzupełnić wodą do 1000 ml),
- 6) bromek etydyny (5 mg bromku etydyny rozpuścić w 1 ml wody).

Wykonanie

1. Trawienie DNA

Wyizolowany DNA podczas **ćwiczenia 8**, zawieszony w buforze TE należy poddać trawieniu RNA-azą i DNA-azą.

1.1. Usuwanie RNA przez trawienie RNA-azą:

Do probówki Eppendorfa pobrać 50 μ l mieszaniny zawierającej DNA i dodać 5 μ l roztworu RNA-azy (w celu pozbycia się balastowego RNA) oraz 10 μ l wody redestylowanej, wymieszać na mieszadle *Vortex* przez 30 s i inkubować 30 minut w łaźni o temperaturze 37°C.

1.2. Trawienie DNA przy użyciu DNA-azy:

Do probówki Eppendorfa pobrać 50 μ l mieszaniny zawierającej DNA i dodać 5 μ l roztworu RNA-azy (w celu pozbycia się balastowego RNA), wymieszać na mieszadle *Vortex* przez 30 s i inkubować 5 minut w łaźni o temperaturze 37°C. Następnie dodać 10 μ l roztworu DNA-azy i ponownie wymieszać na mieszadle *Vortex* przez 30 s. Otrzymaną mieszaninę inkubować 5 godzin w łaźni o temperaturze 37°C.

2. Przygotowanie próbki DNA do elektroforezy

Do jednej probówki Eppendorfa oznaczonej „1” pobrać 30 μ l mieszaniny zawierającej DNA nie trawiony endonukleazami i dodać 3 μ l barwnika obciążającego.

Do drugiej probówki Eppendorfa oznaczonej „2” pobrać 30 μ l mieszaniny zawierającej DNA trawiony RNA-azą (przygotowany w/g punktu 1.1.) i dodać 3 μ l barwnika obciążającego.

Do trzeciej probówki Eppendorfa oznaczonej „3” pobrać 30 μ l mieszaniny zawierającej DNA trawiony DNA-azą i RNA-azą (przygotowany w/g punktu 1.2.) i dodać 3 μ l barwnika obciążającego.

Wszystkie probówki należy wymieszać na mieszadle *Vortex* przez 30 s.

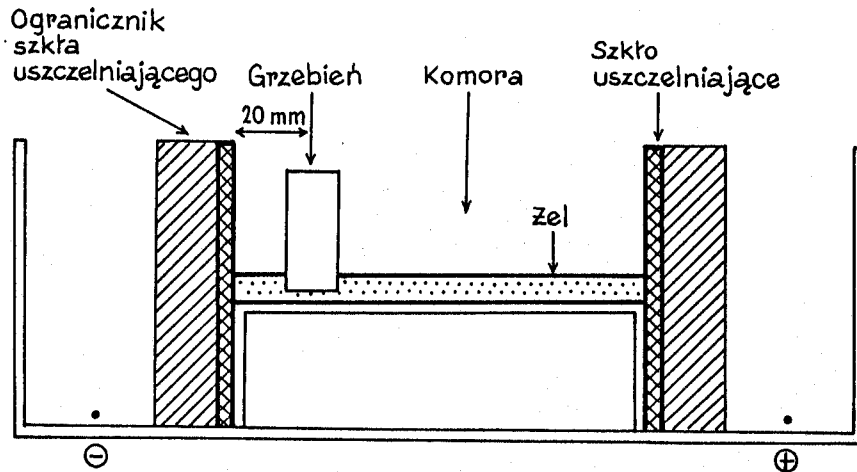
3. Przygotowanie żelu do elektroforezy (na 200 ml roztworu)

Do kolbki stożkowej o pojemności 300 ml dodać:

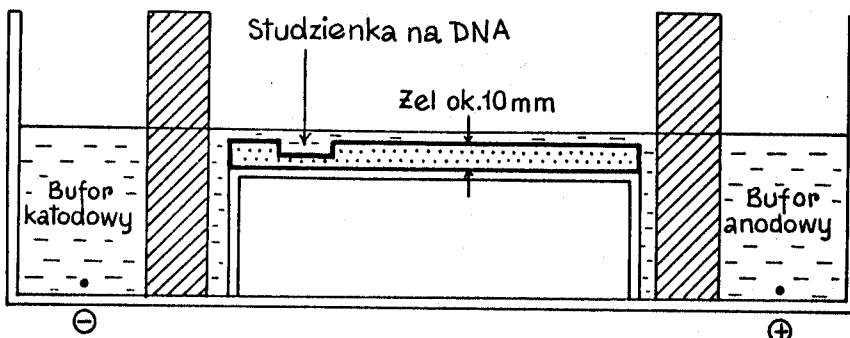
- a) 1,6 g agarozy,
- b) 40 ml buforu elektrodowego o pH 7,8,
- c) 160 ml wody redestylowanej.

Zawartość kolbki wymieszać i ustawić na grzejniku elektrycznym. Roztwór gotować przez 15 minut aż do rozpuszczenia się agarozy. Co 5 minut zawartość kolbki należy zamieszać. Tak przygotowaną agarozę zdjąć z grzejnika i ostudzić do 56°C stale mieszając. Następnie dodać 20 μ l roztworu bromku etydyny.

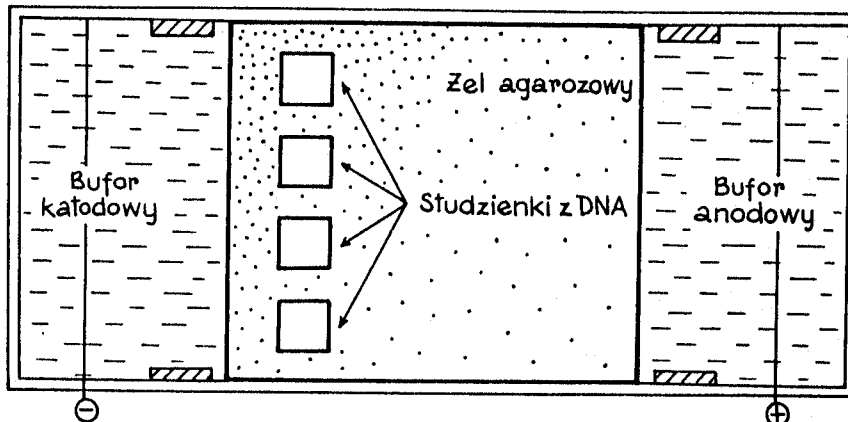
4. Przygotowanie aparatu do elektroforezy



Ryc.1.1 PRZEKRÓJ APARATU PODCZAS ZELIFIKACJI AGAROZY



Ryc.1.2 PRZEKRÓJ APARATU PODCZAS ELEKTROFOREZY



Ryc.1.3 WIDOK Z GÓRY

Ryc. 1. Schemat aparatu do elektroforezy DNA w żelu agarozowym.

W centralnej części aparatu do elektroforezy (ryc. 1.1) zmontować komorę, do której będzie wlewany roztwór agarozy, i sprawdzić jej szczelność.

Nad komorą umieścić pionowo grzebień w odległości 2 cm od katodowego (-) brzegu komory.

Następnie do komory wlać roztwór agarozy przygotowany w/g punktu 3. Żelowanie agarozy następuje po 30 minutach. Po żelifikacji usunąć ruchome szkła uszczelniające komorę. Wyjąć grzebień.

Bufor elektrodowy o pH 7,8 rozcieńczyć wodą 5 razy. Aparat wypełnić rozcieńczonym buforem elektrodowym o pH 7,8 tak, aby żel agarozowy był pokryty 5 mm warstwą tego buforu (ryc. 1.2).

5. Elektroforeza

Do studzienek w żelu nanieść po 30 μ l próbek uprzednio przygotowanych roztworów DNA (ryc. 1.3). Włączyć prąd o kierunku przepływu od katody (-) do anody (+), o natężeniu 70 mA i napięciu 80 V. Elektroforezę prowadzić przez 3 godziny.

Po zakończonej elektroforezie wyłączyć prąd, odłączyć przewody zasilające od aparatu do elektroforezy, żel z elektroforogramem ostrożnie zdjąć z aparatu i przenieść na płytkę szklaną.

7. Analiza elektroforogramów DNA przed i po trawieniu DNA-azą

Żel umieścić na stoliku podświetlarki emitującej promienie *UV* (stolik przed ułożeniem żelu przykryć przezroczystą folią), która powinna znajdować się w ciemnym pokoju i przeanalizować obraz elektroforogramów DNA przed i po trawieniu DNA-azą. Otrzymany obraz DNA po elektroforezie można analizować przy użyciu „Gel Documentation System 5000” firmy *Ultra Violet Products, Ltd*, Cambridge, Anglia, na ekranie monitora.

8. Wnioski i uwagi

Ćwiczenie 10

Temat: Oznaczanie składników cukrowych glikoprotein przy użyciu dwukierunkowej immunoelektroforezy w żelu agarozowym z zastosowaniem lektyn

Podstawy teoretyczne

1. Potranslacyjne modyfikacje białek (glikozylacja).
2. Znaczenie struktury łańcuchów cukrowych w zjawiskach powierzchniowych.
3. Lektyny i ich zastosowanie.

Literatura

1. Swendsen i wsp., (1973): Chemicals, solutions, equipment and general procedures., Scandinavian Journal of Immunology, t. 2, suppl. 1, s. 3-20.
2. Noworytko J., Guzdek A., (1987): Potranslacyjne modyfikacje glikoprotein., Postępy Biochemii, t. 33, nr 1, s. 65-80.
3. Palamarczyk G., (1987): Heterogenność struktury reszt cukrowych N-glikoprotein jako wynik procesów kotranslacyjnych., Postępy Biochemii, t. 33, nr 2-3, s. 297-307.
4. Gamian A. (opracował), (1992): Słownictwo glikoprotein, glikopeptydów i peptydoglikanów., Postępy Biochemii, t. 38, nr 2, s. 81-87.
5. Zwierz K. i wsp., (1992): N-acetylo- β -D-heksozoaminidaza - enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa., Postępy Biochemii, t. 38, nr 3, s. 127-132.
6. Ostrowska L. i wsp., (1993): Rola, właściwości i znaczenie kliniczne N-acetylo- β -heksozoaminidazy., Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, t. 47, nr 1, s. 67-79.
7. Sharon N., Lis H., (1993): Węglowodany w rozpoznawaniu komórek., Świat Nauki, nr 3 (19), s. 56-63.

Cel ćwiczenia

1. Poznanie techniki dwukierunkowej immunoelektroforezy w żelu agarozowym.
2. Rozdzielenie białek surowicy ludzkiej przy użyciu dwukierunkowej immunoelektroforezy w żelu agarozowym z zastosowaniem przeciwciał monowalentnych i lektyn.
3. Identyfikacja końcowych cukrów w łańcuchach policukrowych glikoprotein surowicy ludzkiej na podstawie obrazu elektroforetycznego.

Odczynniki

- 1) bufor elektrodowy Tris/barbital, pH 8,6 (22,4 g barbitalu, 44,3 g Tris, 2 g mleczanu wapnia, 1 g azydku sodu, uzupełnić wodą do 1000 ml),

- 2) 1% agarosa w buforze elektrodowym Tris/barbital, pH 8,6,
- 3) roztwór barwiący (500mg% Coomassie Brilliant blue R 250 w roztworze 10% kwasu octowego w 45% etanolu),
- 4) roztwór odbarwiający (10% kwas octowy w 45% etanolu),
- 5) 0,15 M NaCl,
- 6) 2 mg/ml lektyny nasion fasoli limskiej (LCA) w roztworze buforu elektrodowego Tris/barbital o pH 8,6,
- 7) surowica zawierająca monowalentne przeciwciała anti-AFP,
- 8) surowica zawierająca monowalentne przeciwciała anti-prealbumina,
- 9) wskaźnikowy roztwór błękitu bromofenolowego rozpuszczonego w surowicy.

Wykonanie

1. Przygotowanie aparatów, szkła i roztworów

Komory aparatów do elektroforezy napełnić buforem elektrodowym o pH 8,6. Sprawdzić podłączenie chłodnicy aparatu do rozdziału w I kierunku do kranu z zimną wodą. Probówki i pipety szklane zanurzyć w łaźni wodnej o temperaturze 56°C w celu wygrzania ich. Sporządzić roztwór agarozy rozpuszczając ją w buforze elektrodowym przez zagotowanie na grzejniku elektrycznym.

2. Elektroforeza w I kierunku

2.1. Przygotowanie roztworu agarozy:

Do butelki o pojemności 150 ml odważyć 1 g agarozy do elektroforezy i uzupełnić do 100 ml buforem elektrodowym Tris/barbital o pH 8,6. Dokładnie wymieszać i butelkę zamknąć korkiem. Następnie butelkę z zawiesiną postawić na grzejnik elektryczny i mieszając gotować 10 minut od momentu wrzenia. Po zagotowaniu butelkę z roztworem agarozy wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 56°C.

2.2. Przygotowanie klucza elektrolitycznego:

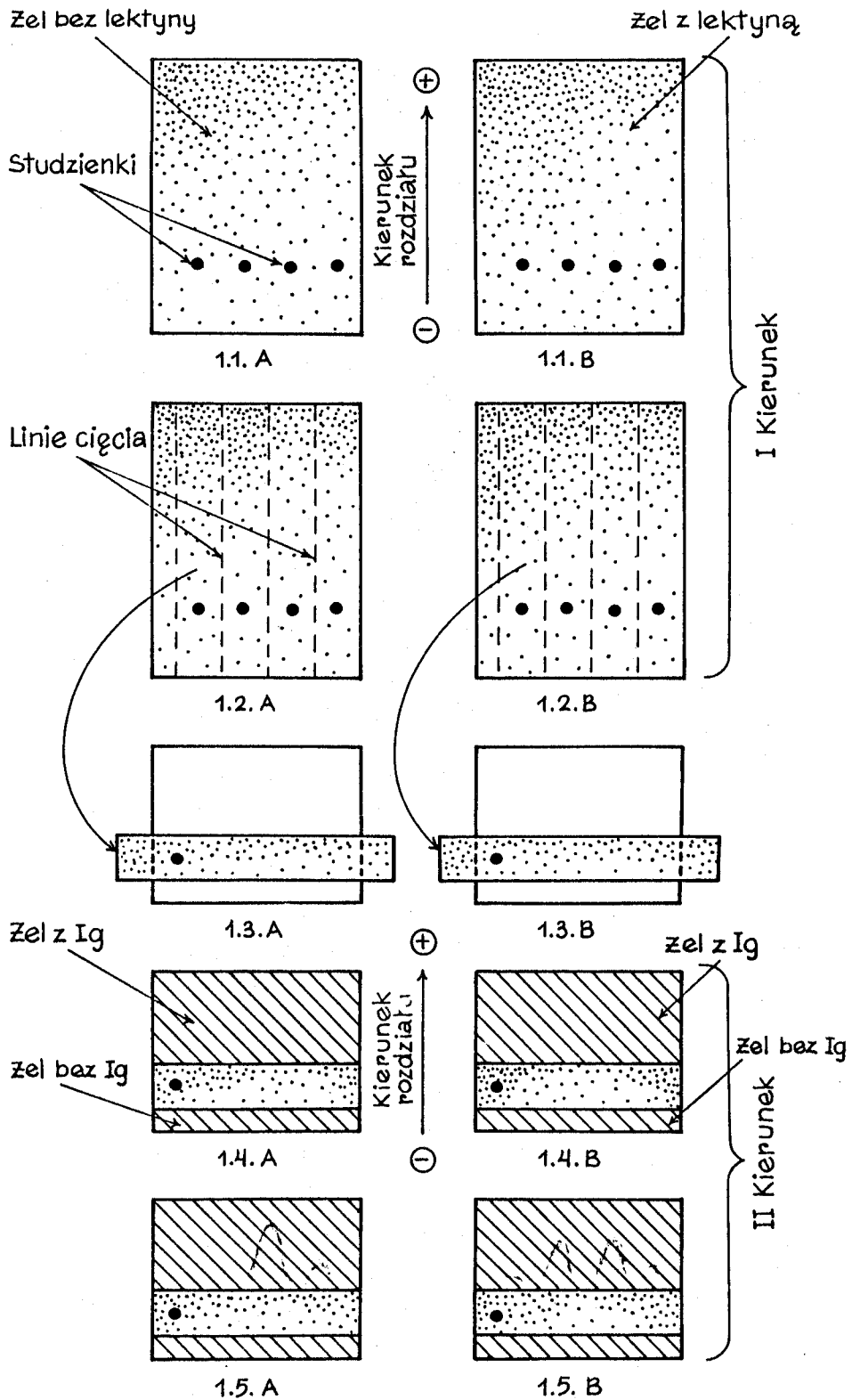
Z bibuły Whatman 3 wyciąć 4 paski o wymiarach 46 × 8,8 cm (w ilości dwóch pasków do jednej płytki z żelem) i złożyć czterokrotnie (po złożeniu ma on wymiary 11,5 × 8,8 cm).

2.3. Przygotowanie płytek z żelem:

Na wypoziomowanym stoliku ułożyć 2 płytki szklane o wymiarach 9 × 12 cm (ryc. 1.1.A i 1.1.B).

Do jednej wygrzanej probówki odmierzyć wygrzaną pipetą 18 ml roztworu agarozy o temperaturze 56°C i wylać równomiernie na płytkę (ryc. 1.1.A).

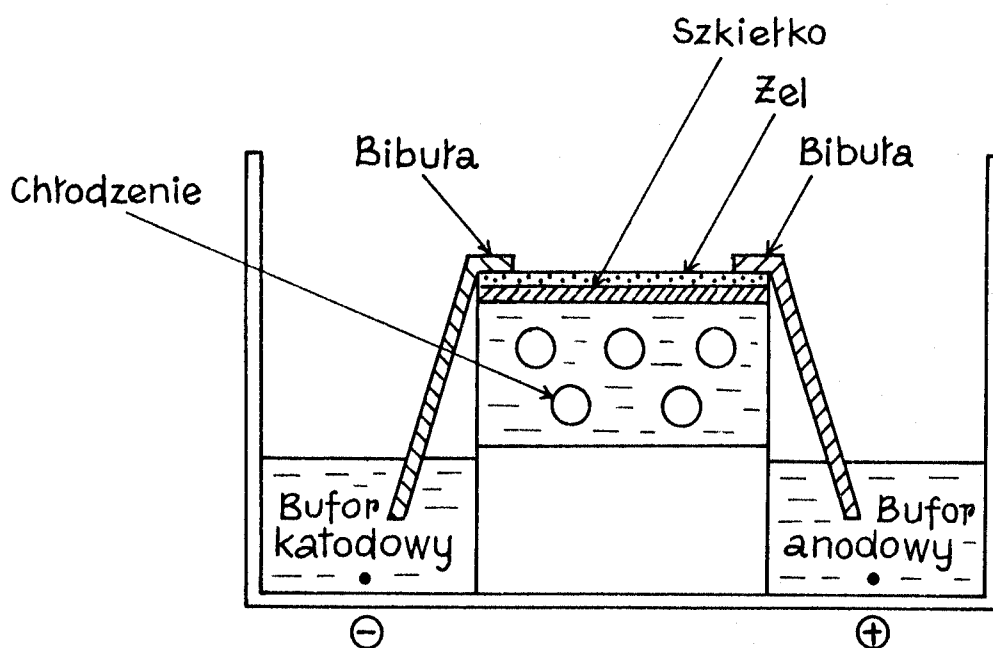
Do drugiej wygrzanej probówki odmierzyć wygrzaną pipetą 18 ml roztworu agarozy o temperaturze 56°C i 20 µl roztworu lektyny, wymieszać przez odwracanie zatykając probówkę palcem i wylać równomiernie na płytkę (ryc. 1.1.B).



Ryc. 1. Przygotowanie żeli agarozowych do dwukierunkowej immunoelektroforezy bez użycia lektyny (A.) i z użyciem lektyny (B.) oraz barwienie uzyskanych elektroforogramów (opis w tekście).

Po zżelowaniu agarozы płytki ułożyć na papierze milimetrowym (ryc. 1.1.A i 1.1.B) i dziurkaczem wykonać 8 studzienek w jednocentymetrowych odstępach wzdłuż krótszego brzegu płytki, w odległości 3 cm od krótszego brzegu.

2.4. Przygotowanie elektroforezy:



Ryc. 2. Schemat aparatu do immunoelektroforezy w pierwszym kierunku.

Odkręcić kran z wodą, do którego jest podłączony wąż chłodnicy aparatu do elektroforezy.

Płytki ułożyć na stoliku aparatu do elektroforezy z chłodzeniem (ryc. 2) tak, aby studzienki były przy katodzie (-) (ryc. 1.1.A i 1.1.B). Przygotowany uprzednio pasek bibuły Whatman 3, o wymiarach 11,5 × 8,8 cm, namoczyć w buforze elektrodowym Tris/barbital o pH 8,6 (bufor znajduje się w kuwecie) i ułożyć dłuższym brzegiem na płytce z agarozą od strony katodowej (-) tak, aby drugi dłuższy brzeg był zanurzony w buforze. Następnie z drugim paskiem bibuły postąpić jak z pierwszym i ułożyć od strony anodowej (+). Powstaje tzw. klucz elektrolityczny.

Do pierwszej studzienki nanieść 10 µl surowicy z roztworem błękitu bromofenolowego. Następnie do każdej z pozostałych studzienek nanieść mikropipetą (każdorazowo zmieniając końcówkę, tzw. „tipsa”) po 10 µl badanej surowicy.

2.5. Właściwa elektroforeza:

Aparat do elektroforezy podłączyć do zasilacza prądu i sprawdzić prawidłowość podłączenia biegunów prądu do elektrod. Włączyć prąd i ustawić na zasilaczu napięcie 260 V i natężenie prądu 40 mA. Elektroforezę prowadzić przez ok. 2 godziny, aż cała plama błękitu bromofenolowego wejdzie w bibułę przy anodzie (+).

Po zakończonej elektroforezie wyłączyć zasilacz prądu i odłączyć go od aparatu do elektroforezy.

3. Elektroforeza w II kierunku

3.1. Przygotowanie klucza elektrolitycznego:

Z bibuły Whatman 3 wyciąć paski o wymiarach $23 \times 8,8$ cm w ilości dwóch pasków do jednej płytki z żelem i złożyć dwukrotnie (po złożeniu ma on wymiary $11,5 \times 8,8$ cm).

3.2. Przeniesienie pasków żelu po rozdziale w I kierunku na płytki do rozdziału w II kierunku:

Płytkę po rozdziale w I kierunku zdjąć z aparatu do elektroforezy i ułożyć na stoliku podkładając pod płytkę papier milimetryowy. Żel pociąć na paski (ryc. 1.2.A i 1.2.B) o szerokości 1 cm wzdłuż kierunku rozdziału mieszaniny białek.

Pojedynczy pasek wyciętego żelu zawierający rozdzielone białka przenieść na szkiełko o wymiarach $6,5 \times 9$ cm (ryc. 1.3.A i 1.3..) w odległości 1 cm od dłuższego brzegu szkiełka tak, aby końce paska żelu zwiisały równo z obu krótszych brzegów szkiełka i następnie obciąć te końce równo ze szkiełkiem. Na szkiełku powstają dwa wolne pola: mniejsze i większe.

3.3. Przygotowanie płytek z żelem do rozdziału w II kierunku (ryc. 1.4.A i 1.4.B):

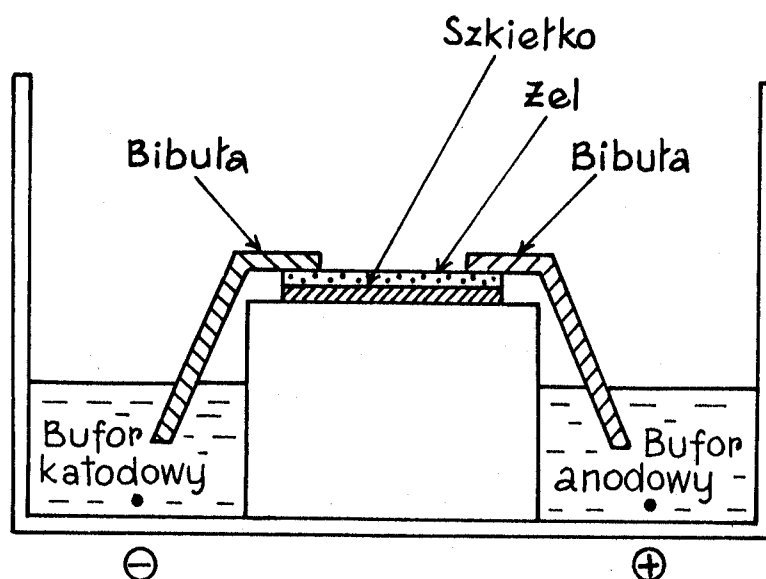
Do nagrzananej do temperatury 56°C probówki wlać 1,5 ml roztworu agarozy o temperaturze 56°C i wylać na powstałe mniejsze wolne pole na szkiełku do elektroforezy w II kierunku (1,5 ml agarozy można rozlać bezpośrednio z pipety).

Następnie do nagrzananej do temperatury 56°C probówki wlać 8 ml agarozy i 50 μl surowicy monowalentnej anty-AFP i 30 μl surowicy anty-prealbuminowej, wymieszać przez odwracanie zatykając probówkę palcem i wylać równomiernie na większe wolne pole na płytce.

3.4. Przygotowanie elektroforezy:

Płytki po elektroforezie w I kierunku bez lektyny (ryc. 1-1.4.A) i z lektyną (ryc. 1-1.4.B) ułożyć na stoliku aparatu do elektroforezy bez chłodzenia (ryc. 3) tak, aby dłuższe brzegi były ułożone wzdłuż elektrod i aby mniejsze pole było przy katodzie (-). Przygotowane uprzednio paski z bibuły Whatman 3, o wymiarach $11,5 \times 8,8$ cm, namoczyć w buforze elektrodowym Tris/barbital o pH 8,6 (bufor znajduje się w kuwecie) i ułożyć jednym brzegiem na płytkę z agarozą tak, aby drugi brzeg był zanurzony w

buforze; jeden pasek przy anodzie (+), a drugi przy katodzie ().



Ryc. 3. Schemat aparatu do immunoelektroforezy w drugim kierunku.

3.5. Właściwa elektroforeza:

Włączyć prąd o napięciu 60 V. Elektroforezę przeprowadzać ok 20 godzin. Po tym czasie wyłączyć zasilacz prądu i odłączyć go od aparatu do elektroforezy.

4. Suszenie żelu

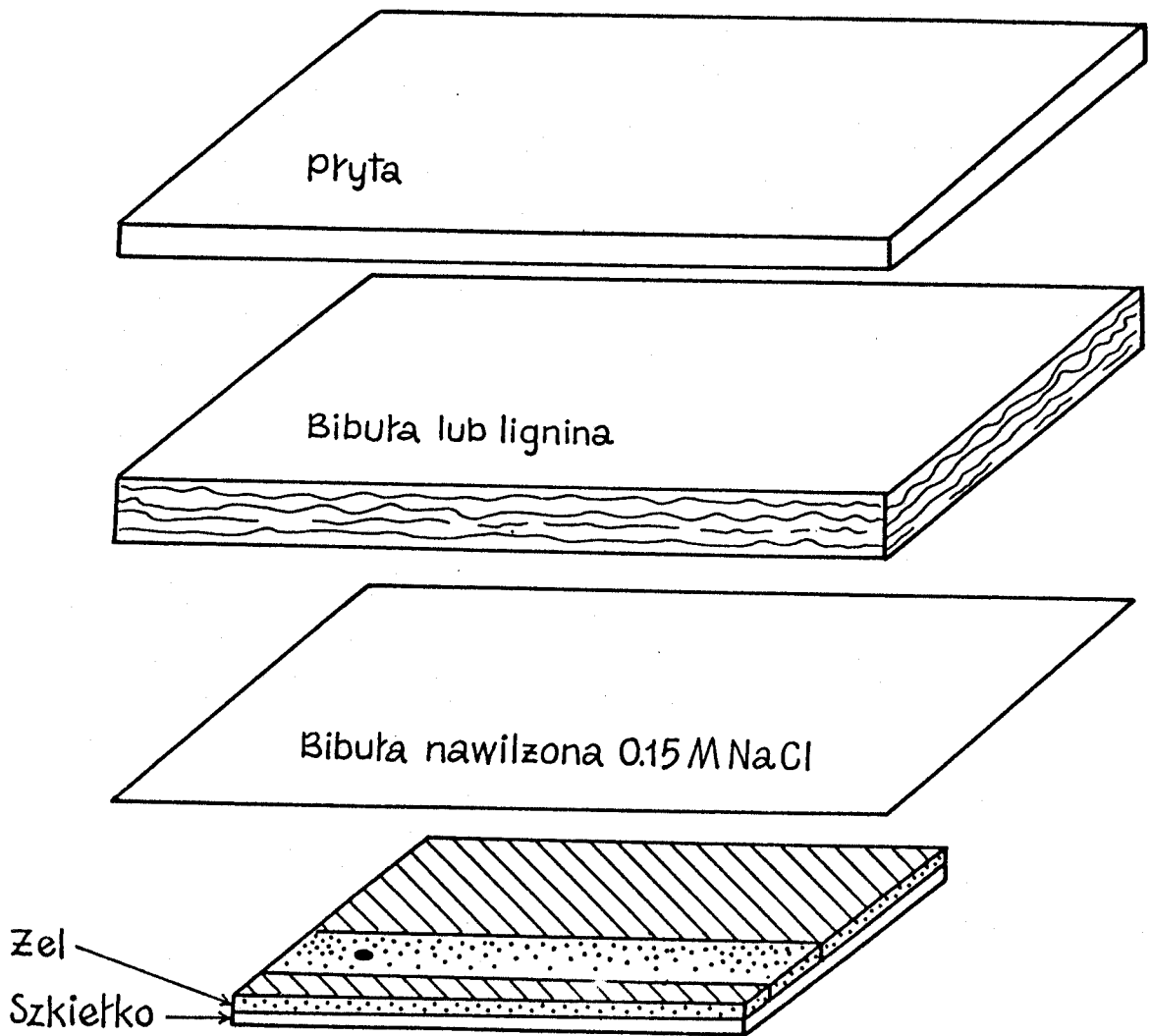
Po skończonej elektroforezie płytki z żelem umieścić na 3 godziny w 0,15 M NaCl.

Następnie płytki z żelem ułożyć na stole (ryc. 4) pokryć bibułą Whatman 1 nasączoną roztworem 0,15 M NaCl, ułożyć na tym kilkadziesiąt warstw suchej bibuły, przycisnąć równomiernie płaską płytą (nie za mocno) do wyschnięcia. Żel trwale przykleja się do szkiełka. Zdjąć warstwy bibuły, a ostatnią warstwę przyklejoną do żelu przed zdjęciem spryskać wodą. Żele suszyć w strumieniu ciepłego powietrza suszarki.

5. Barwienie żeli

Płytki z żelami umieścić w kuwecie z roztworem barwiącym na 1 min., a następnie przeprowadzić przez szereg kuwet z roztworami odbarwiającymi (płukać w każdym ok. 1 min.) do uzyskania bezbarwnego tła. Żele suszyć suszarką ustawiając szkiełka pionowo na bibule.

Po wysuszeniu można analizować uzyskane obrazy elektroforogramów (ryc. 1.5.A i 1.5.B).



Ryc. 4. Sposób suszenia żeli agarozowych po dwukierunkowej immunoelektroforezie.

6. Wnioski i uwagi

Tematy seminariów na ćwiczenia 1-15

Ćwiczenie 1

1. Właściwości grup funkcyjnych: aminowych, karboksylowych, alkoholowych, hydroksylowych i sulfhydrylowych.
2. Wzory aminokwasów.
3. Właściwości aminokwasów.
4. Krzywe miareczkowania aminokwasów.
5. Sposoby identyfikacji aminokwasów, w tym aminokwasów *N*- i *C*-końcowych.

Ćwiczenie 2

1. Znaczenie pojęć: osmoza, dializa, koagulacja, denaturacja.
2. Budowa i właściwości peptydów i białek.
3. Metody izolacji i oczyszczania białek.
4. Sposoby badania składu i struktury białek.
5. Kryteria jednorodności białek: elektroforeza, elektroogniskowanie, chromatografia, oznaczanie aminokwasów *N*- i *C*-końcowych.

Ćwiczenie 3

1. Definicje: układ, otoczenie, energia wewnętrzna, ciepło reakcji w stałej objętości.
2. Entalpia, ciepło reakcji pod stałym ciśnieniem.
3. Entropia.
4. Potencjał termodynamiczny *G.F.*
5. Obliczenia termodynamiczne.
6. Kinetyka reakcji - szybkość reakcji i stała szybkości reakcji.
7. Stała równowagi.
8. Enzym jako katalizator.
9. Stała Michaelisa.
10. Inhibitory.

Ćwiczenie 4

1. Zasady pirymidynowe i purynowe.
2. Nukleotydy - wzory: ATP, CTP, UTP, TTP, NAD, NADP, FAD, PAPS, CoA, UDP-glukozy.
3. Kwasy nukleinowe: DNA, mRNA, tRNA, rRNA.
4. Nukleosom, solenoid, histony.

Ćwiczenie 5

1. Jednostki aktywności enzymatycznej.

2. Klasyfikacja enzymów.
3. Swoistość katalizy enzymatycznej (przykłady).
4. Izoenzymy.

Ćwiczenie 6

1. Cytoplazmatyczny metabolizm pośredni.
2. Fosforoliza i glikogenoliza.
3. Przemiany heksoz: od glikogenu do laktozy i od laktozy do glikogenu (wzory, reakcje, enzymy, energetyka procesu).
4. Glikoliza: od glikogenu lub skrobi do kwasu pirogronowego lub kwasu mlekowego (wzory, reakcje, enzymy, energetyka procesu).

Ćwiczenie 7

1. Oksydacyjna dekarboksylacja kwasu pirogronowego i kwasu α -ketoglutazarowego.
2. Cykl Krebsa (wzory, reakcje, enzymy).
3. Energetyka cyklu Krebsa.
4. Rola karnityny w transporcie kwasów tłuszczowych do mitochondriów.
5. β -oksydacja kwasów tłuszczowych (wzory, reakcje, enzymy).
6. Energetyka β -oksydacji kwasów tłuszczowych.

Ćwiczenie 8

1. Glukoneogeneza - „odwrócenie” procesu glikolizy.
2. Powstawanie i rozkład ciał ketonowych.
3. Transaminacja (przykłady, mechanizm).
4. Transport azotu i grup aminowych od alaniny do mocznika.
5. Znaczenie i energetyka cyklu mocznikowego.
6. Katabolizm łańcuchów węglowych aminokwasów (proliny, argininy, leucyny, fenyloalaniny i tyrozyny).

Ćwiczenie 9

1. Katabolizm kwasów nukleinowych, endonukleazy restrykcyjne.
2. Łańcuch oddechowy - wzory koenzymów biorących udział w tym procesie.
3. Potencjał utleniająco-redukcyjny.
4. Oksydacyjna fosforylacja i kontrola oddechowa tego procesu.
5. Szczególna rola ATP w metabolizmie komórki.

Ćwiczenie 10

1. Cykl pentozowy (rola cyklu, reakcje, wzory, enzymy).
2. Katabolizm cukrów, białek, kwasów nukleinowych i tłuszczów.

3. Połączenie przemian cukrów, aminokwasów, kwasów tłuszczowych i glicerolu z cyklem Krebsa i glikolizą.
4. Losy grupy aminowej w ustroju.
5. Losy łańcuchów węglowych aminokwasów (aminokwasy glikogenne, aminokwasy ketogenne, aminokwasy gliko- i ketogenne).
6. Biosynteza kwasów tłuszczowych.
7. Biosynteza nienasyconych kwasów tłuszczowych.
8. Wydłużanie łańcuchów kwasów tłuszczowych.

Ćwiczenie 11

1. Biosynteza tłuszczów prostych i złożonych.
2. Biosynteza prostaglandyn.
3. Biosynteza cholesterolu, kwasów żółciowych i hormonów sterydowych.
4. Droga węgla od skrobi pokarmowej do kwasu palmitynowego wbudowanego do trójpalmitynianu gliceryny.
5. Droga węgla od kwasu palmitynowego trójpalmitynianu gliceryny do CO_2 .

Ćwiczenie 12

1. Biosynteza nukleotydów purynowych i pirymidynowych.
2. Biosynteza rybo- i deoksyrybonukleotydów.
3. Biosynteza DNA.
4. Biosynteza RNA - potranskrypcyjne modyfikacje kwasów rybonukleinowych.

Ćwiczenie 13

1. Droga węgla C4 i C5 pierścienia purynowego adeniny (od glikogenu do adeniny wbudowanej w mRNA).
2. Droga węgla pierścienia pirymidynowego cytozyny (od glikogenu do cytozyny wbudowanej w rRNA).
3. Droga azotu pierścienia pirymidynowego uracylu (od alaniny białka do uracylu wbudowanego w tRNA).
4. Droga węgla rybozy (od glikogenu do GMP wbudowanego w mRNA).

Ćwiczenie 14

1. Biosynteza białka.
2. Droga węgla od glikogenu do alaniny wbudowanej w białko.
3. Potranslacyjne modyfikacje białek:
 - a) biosynteza oligosacharydów związanych z białkiem *N*-glikozydowo,
 - b) biosynteza oligosacharydów związanych z białkiem *O*-glikozydowo,
 - c) biosynteza proteoglikanów,
 - d) biosynteza hemoprotein.
4. Biosynteza i rozpad hemu.
5. Biochemia elementów kurczliwych.

Ćwiczenie 15

1. Regulacje metaboliczne.
2. Droga węgla od tyrozyny białka do CO_2 .
3. Droga węgla od alaniny białka do glikogenu wątroby.
4. Droga węgla od skrobi pokarmowej do alaniny wbudowanej do białka mięśni.
5. Droga azotu od cysteiny białka do adeniny wbudowanej w rRNA.
6. Droga węgla od glikogenu wątroby do hemu.
7. Droga węgla od mannozy do kwasu cholowego.
8. Droga węgla od tyrozyny białka do guaniny wbudowanej w mRNA.
9. Droga węgla od tyrozyny mięśni do glikogenu mięśni.
10. Droga węgla od galaktozy do deoksyrybozy d-TMP wbudowanej w DNA.
11. Droga węgla od sacharozy pokarmowej do kwasu stearynowego wbudowanego do trójglicerydu tkanki tłuszczowej.

Podręczniki

1. Biochemia praktyczna, pod red. W. Tysarowskiego, PZWL, Warszawa, 1968.
2. Instrukcja do ćwiczeń z biochemii dla studentów AM w Białymstoku, pod red. W. Rzeczyckiego, Wydawnictwo AMB, Białystok, 1977.
3. Kurs praktyczny z biochemii, W. Mejbaum-Katzenellenbogen i I. Mochlinska, PWN, Warszawa, 1966.
4. Obliczenia biochemiczne, A. Zgirski i R. Gondko, PWN, Warszawa, 1976.
5. Praktikum z biochemii, pod red. W. Brzeskiego i Z. Kaniugi, PWRiL, Warszawa, 1968.

