

## 7. Oznaczanie zawartości kwaśnej fosfatazy w homogenacie z ziemniaka

Fosfataza kwaśna (EC 3.1.3.2) stanowi „enzym znacznikowy” lizosomów, głównego miejsca trawienia wewnątrzkomórkowego. Fosfatazy to grupa enzymów należących do klasy hydrolaz (klasa 3 – obejmuje enzymy katalizujące hydrolityczny rozpad wiązań chemicznych, tabela 1), podklasy enzymów hydrolizujących wiązania estrowe (esterazy), podpodklasy hydrolaz monoestrów fosforanowych.

Tabela 1. Klasy enzymów (wg Koolmana i Röhma 2005).

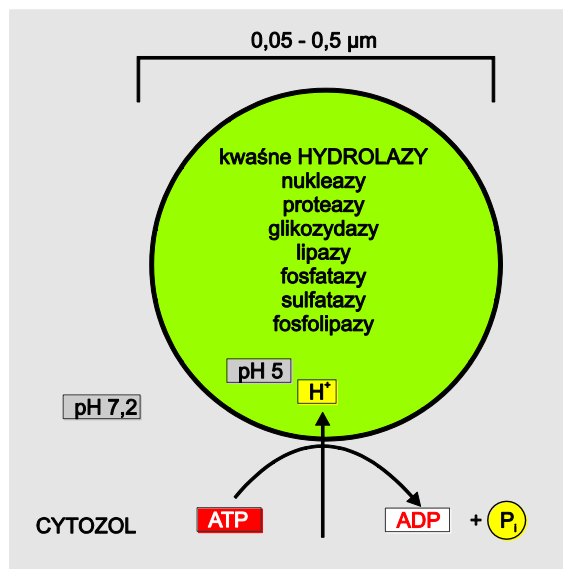
klasa	ważne podklasy
1. oksyreduktazy	dehydrogenazy oksydazy, peroksydazy reduktazy monooksygenazy dioksygenazy
2. transferazy	C <sub>1</sub> -transferazy glikozylotransferazy aminotransferazy fosfotransferazy
3. hydrolazy	esterazy glikozydazy peptydazy amidazy
4. liazy	liazy C-C liazy C-O liazy C-N liazy C-S
5. izomerazy	epimerazy izomerazy cis-trans transferazy wewnątrzczasteczkowe
6. ligazy	syntetazy C-C syntetazy C-O syntetazy C-N syntetazy C-S

Enzymy te katalizują odszczepienie reszty fosforanowej od cukrów, białek, tłuszczu, nukleotydów i wielu innych występujących w przyrodzie estrów kwasu fosforowego według poniższej reakcji:



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

Fosfatazy działają w pH alkalicznym, z optymalnym pH w zakresie 9,0 – 11,0, a także w pH kwaśnym i obojętnym, w zakresie 4,5 – 7,0. Te ostatnie są typowe dla komórek roślinnych, chociaż nie brakuje ich także w komórkach zwierzęcych, gdzie występują przede wszystkim w lizosomach, niewielkich błonowych pęcherzykach będących głównym miejscem trawienia wewnątrzkomórkowego. Lizosomy zawierają specyficzny zestaw hydrolaz, optymalnie aktywnych w środowisku kwaśnym, uczestniczących w rozkładzie organelli komórkowych i wszystkich rodzajów makrocząsteczek dostarczanych do komórki różnymi drogami. Wiodącym enzymem jest tu kwaśna fosfataza uznawana za tzw. „enzym znacznikowy” lizosomów. Kwaśne środowisko światła lizosomu (pH ~ 5) utrzymywane jest dzięki działaniu błonowej H<sup>+</sup>-ATPazy, pompującej H<sup>+</sup> z cytozolu do wnętrza lizosomu (Rys. 1).



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

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

Odczynniki i sprzęt:

1. 50 g Ziemniaków
1. Próbówki szklane
2. Pipety o pojemności 1 mL i 5 mL
3. Statywy do próbek
4. Łaźnia wodna
5. Spektrofotometr UV-VIS
6. Tarka do ziemniaków
7. Kolba stożkowa 500 mL
8. Lejek Büchnera, sączki
9. 10 mL 0,005 M Roztwóru soli dwusodowej kwasu nitrofenylofosforanowego (przygotować bezpośrednio przed użyciem)
10. 5 mL 0,1 M Buforu cytrynianowego o pH 5,3
11. 15 mL 1 N roztworu NaOH
12. 10 mL 0,005 M Roztwór *p*-nitrofenolu w wodzie

Wykonanie doświadczenia:

#### **A. Izolacja ekstraktu enzymatycznego**

Okolo 50 g obranego i umytego ziemniaka zetrzeć na tarce i przesączyć przez sączek. Zmierzyć objętość wyciągu z ziemniaka (ml) i odstawić do lodówki lub do łaźni lodowej.

### B. Oznaczanie aktywności enzymatycznej

Do pięciu ponumerowanych probówek laboratoryjnych odpipetować roztwory według następującego schematu:

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

Probówki, po dokładnym wymieszaniu dodanych roztworów, wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 10 minut. Następnie do każdej próbówki odpipetować szybko po 2 mL 0,005 M roztworu nitrofenylofosforanu sodu o temperaturze 37°C i poddać inkubacji w temperaturze 37°C przez okres podany przez prowadzącego ćwiczenia (od 10-45 minut). Dokładnie po tym czasie do każdej próbówki dodać po 1 mL 1 N roztworu NaOH i całość wymieszać. Następnie dla każdej próbówki wykonać 8-krotne rozcieńczenie w wodzie i przeprowadzić pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda = 430$  nm wobec wody destylowanej.

Równolegle przygotować w probówkach roztwory o następującym składzie:

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

Następnie dla każdej próbówki wykonać 8-krotne rozcieńczenie w wodzie i zmierzyć wartości absorbancji ( przy  $\lambda = 430$  nm ) roztworów i sporządzić krzywą wzorcową dla *p*-nitrofenolu.

Sporządzić wykres odkładając na osi rzędnych  $\mu\text{mole zhydrolizowanego substratu/min.}$ , a na osi odciętych ilość dodanego homogenatu w mL.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć liczbę jednostek enzymatycznych (U) kwaśnej fosfatazy zawartych w 1 g ziemniaka.