

CAPITOLUL I

Structura și funcțiile proteinelor. Enzimele

Partea I. Proteinele

Din toți compușii organici proteinele au cea mai complexă structură și prezintă cel mai important component al materiei vii.

Proteinele sunt heteropolimeri ai α -aminoacizilor cu o masă moleculară mare. Legându-se între ei prin legătura peptidică $-\text{CO}-\text{NH}-$, ei formează lanțuri polipeptidice. Legătura peptidică apare ca rezultat al reacției dintre gruparea carboxil a unui aminoacid și gruparea amino a altuia. Reacția este însoțită de eliminarea unei molecule de apă. La hidroliza totală a moleculei proteice are loc ruperea legăturilor peptidice și obținerea unui amestec de α -aminoacizi.

Varietatea colosală de proteine în natură este determinată de componența aminoacidă și de succesiunea aminoacizilor în catena polipeptidică. Pentru fiecare proteină este caracteristică o anumită succesiune a resturilor de aminoacizi care și este considerată ca *structură primară* a moleculei proteice. Lanțul polipeptidic de regulă se răsucește în formă de spirală formând *structura secundară* a moleculei proteice. Aceasta la rândul său se răsucește într-un mod complicat, dar strict specific, căpătând o configurație spațială numită *structură terțiară*.

Unele molecule proteice sunt formate din câteva lanțuri polipeptidice, de obicei perechi, identice sau diferite de structura primară, secundară și terțiară, care poartă denumirea de subunități sau protomeri. Ele formează un tip de molecule proteice cu proprietăți fizico-chimice și biologice specifice din punct de vedere structural și funcțional. Acest nivel de structură a moleculei proteice poartă denumirea de *structură cuaternară*.

Pentru menținerea configurației spațiale, molecula proteică mai are nevoie de unele legături suplimentare. Mai importante sunt legăturile de hidrogen, care apar între atomii de hidrogen ai grupării $-\text{NH}-$ (sau $-\text{CH}-$) și atomii de oxigen ai grupării $-\text{CO}-$, disulfidice ($-\text{S}-\text{S}-$) și ionice, care apar între grupările amino cu sarcini pozitive ale acizilor diamino-monocarboxilici și grupările carboxil cu sarcini negative ale acizilor monoaminodicarboxilici.

Structura moleculei proteice este foarte labilă și se modifică ușor sub acțiunea factorilor fizici și chimici. Ca rezultat al acestor acțiuni se modifică proprietățile fizice, chimice și biologice ale moleculei.

Este necesar de a putea folosi cunoștințele despre structura, proprietățile fizice și chimice ale proteinelor, funcțiile lor, componența proteică a organelor și țesuturilor în normă și în diferite leziuni în vederea elucidării funcțiilor organismului în normă și tulburarea lor în patologie.

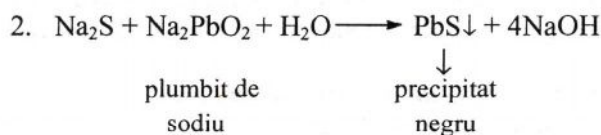
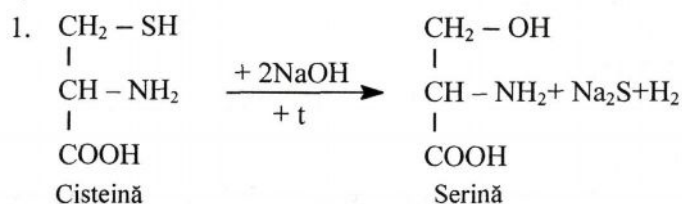
TEMA 1

Importanța biochimiei pentru medicină.

Aminoacizii. Reacțiile de culoare ale proteinelor și aminoacizilor

Experiența 1. Reacția de identificare a aminoacizilor ce conțin sulf legat slab (reacția Fol).

Principiul metodei. La degradarea proteinelor și peptidelor sub acțiunea hidroxidului de sodiu din grupările sulfhidril se eliberează sulfurul sub formă de sulfură de sodiu, care reacționând cu plumbitul de sodiu, formează precipitatul de sulfură de plumb (PbS) de culoare neagră sau brună. Ecuația reacției:



Metionina, spre deosebire de cisteină și cistină, nu dă această reacție, deoarece sulfurul în acest aminoacid este legat trainic.

Mod de lucru. La 5 picături de ovalbumină se adaugă 5 picături de reactiv Fol. Amestecul se pune la fiert. După 1–2 minute de fierbere apare un precipitat negru sau brun de sulfură de plumb (PbS).

Reactivul Fol prezintă un amestec de volume egale de acetat de plumb de 5% și NaOH de 30%.

Experiența 2. Reacția de culoare pentru tirozină (reacția Millon).

Principiul metodei. Reactivul Millon la cald dă cu tirozina o colorație roșie. Reacția este caracteristică aminoacizilor care au în structură un nucleu fenolic.

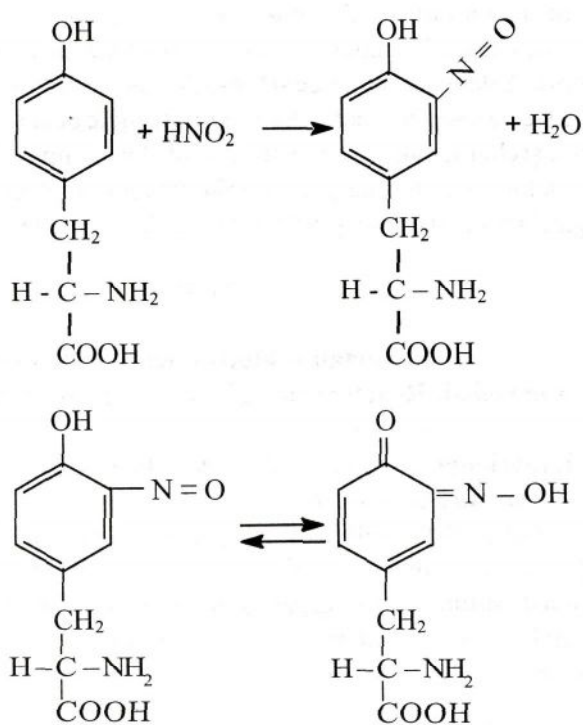
Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau câteva cristale de tirozină la care se adaugă acid sulfuric de 2,5%. Conținutul eprubetei se agită pînă la dizolvarea completă a cristalelor.

Se adaugă 1 ml de reactiv Millon, se agită și se lasă la temperatura camerei. Peste un timp se observă apariția unei colorații roz-roșiatice sau a unui precipitat cărămiziu. Temperatura ridicată facilitează apariția colorației.

Reactivul Millon prezintă un amestec de mercur cu acid azotic concentrat și apă distilată (puțin NaNO_2).

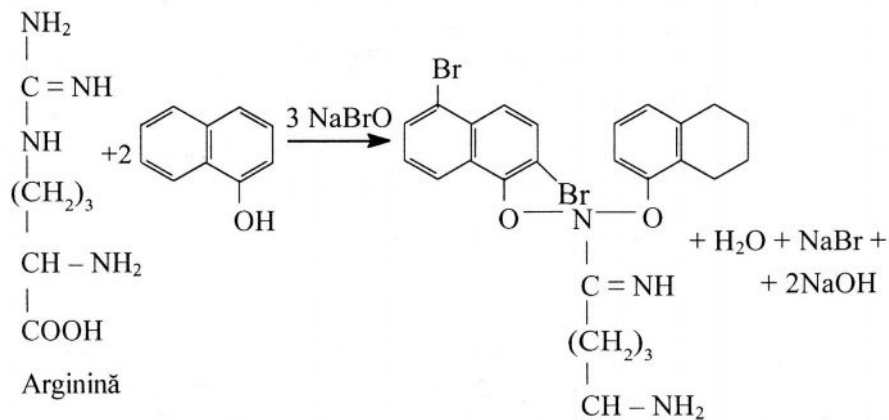
Experiența 3. Reacția de culoare pentru arginină (Reacția Sakaguci).

Principiul metodei. Arginina, fiind tratată cu α -naftol în prezența hipocloritului de sodiu sau hipobromitului de sodiu, dă o colorație roșie caracteristică. Reacția este specifică grupării guanidinice din structura argininei. La oxidarea de mai departe a naftolargininei se formează un compus de tipul chinoniminei.



Derivat al o-chinonoximei

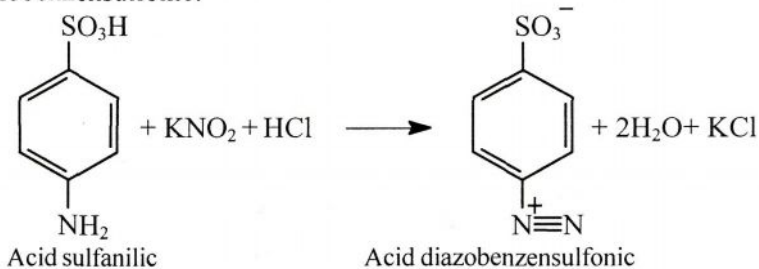
Derivații chinoniminei (în cazul de față naftochinonimina), la care hidrogenul grupării iminice este substituit de un radical alchil sau aril, întotdeauna sunt colorați în nuanțe galben-roșiatice. Culoarea roșie-portocalie a soluției în cazul reacției Sakaguci se explică prin apariția derivatului naftochinoniminei.



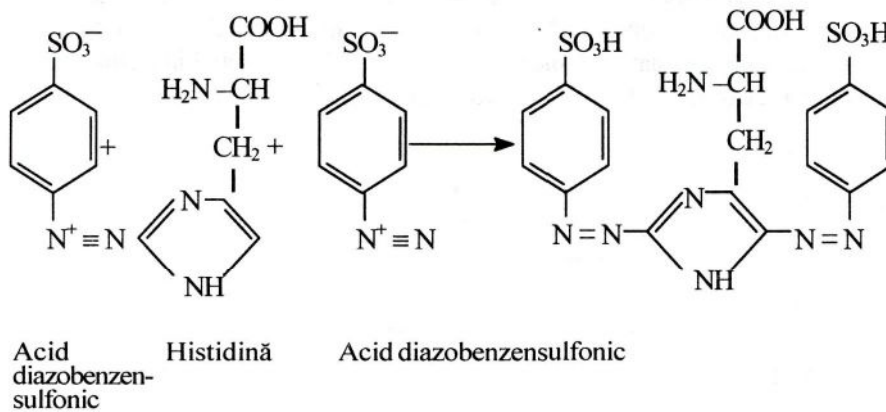
Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau 2 ml soluție de 0,01% de arginină la care se adaugă 2 ml soluție de hidroxid de sodiu de 10% și câteva picături soluție alcoolică de α -naftol de 0,2%. Conținutul eprubetei se agită bine și se adaugă 0,5 ml soluție de hipobromit de sodiu și iarăși se agită. Imediat se adaugă 1 ml soluție de uree de 40% pentru stabilizarea colorației roșii-portocalii apărute.

Experiența 4. Reacția de culoare pentru histidină (reacția Pauli).

Principiul metodei. La interacțiunea acidului sulfanilic cu nitrit de potasiu se produce reacția de diazotare și are loc formarea acidului diazobenzensulfonic:



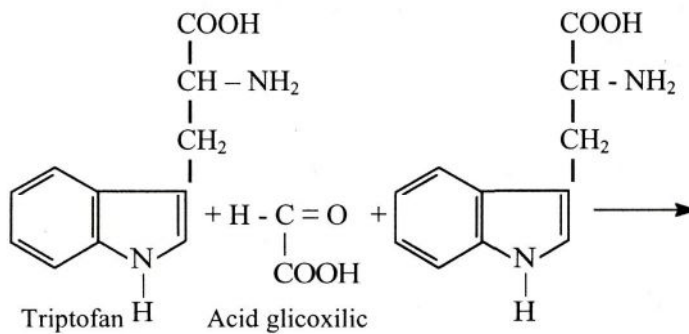
În reacția dintre histidină și acidul diazobenzensulfonic format se obține o colorație roșie-vișinie:

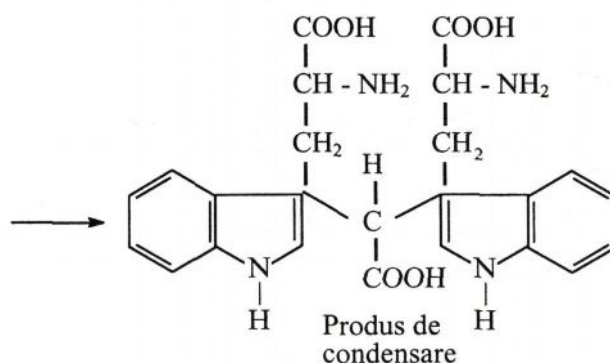


Mod de lucru. La 1 ml soluție de acid sulfanilic de 1% în soluție de acid clorhidric de 5% se adaugă 2 ml soluție de nitrit de potasiu de 0,5%. Eprubeta se agită și se adaugă 2 ml soluție de histidină de 0,01%. După agitare se mai adaugă 6 ml soluție de carbonat de sodiu de 10%. Apare o colorație roșie-vișinie.

Experiența 5. Reacția de culoare pentru triptofan (reacția Adamkiewick-Hopkins).

Principiul metodei. Soluțiile de triptofan fiind tratate cu acid glicoxilic în prezența acidului sulfuric concentrat formează la nivelul zonei de contact un inel violaceu. Reacția este specifică inelului indolic.





Mod de lucru. La 5 ml soluție de triptofan de 0,5% se adaugă 3 ml de acid acetic glacial. Pe pereții eprubetei se introduc cu atenție 2-3 ml de acid sulfuric concentrat, astfel ca cele două lichide să se stratifice. La limita de separație dintre cele două soluții va apărea un inel violaceu.

Experiența 6. Reacția de culoare pentru metionină (după Mack-Karty și Sullivan).

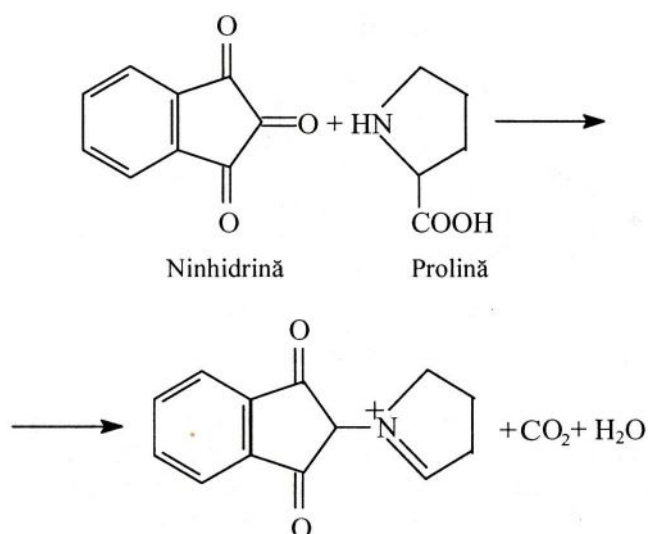
Principiul și modul de lucru. La 5 ml soluție de metionină de 0,02% se adaugă prin agitare mai întâi 1 ml soluție de hidroxid de sodiu de 14,3 N, apoi 0,3 ml soluție proaspăt pregătită de nitroprusid de sodiu de 0,1%. Amestecul se încălzește timp de 10 min pe baia de apă la temperatura de 35–40°C. Apoi eprubeta se răcește sub un jet de apă rece timp de 2 minute și se adaugă prin agitare 5 ml de amestec de acid clorhidric și fosforic. Eprubeta se agită 1 minut și se răcește 10 minute. Apare o colorație roșie-violetă.

Experiența 7. Reacția de culoare pentru glicină (reacția Timerman).

Principiul și modul de lucru. La 2 ml soluție de glicină de 0,01% la un pH = 8,0, obținut prin adăugarea soluției de 10% de hidroxid de sodiu, se adaugă 0,5 ml soluție de dialdehidă o-ftalică. Amestecul imediat se colorează în verde-aprins. Peste câteva minute apare un sediment de culoare verde.

Experiența 8. Reacția de culoare pentru prolină.

Principiul metodei. Ninhidrina interacționează cu aminoacidul prolina. Produsul de condensare are o colorație galben-deschisă:



Mod de lucru. La 3 ml soluție de prolină de 0,01% se adaugă câteva picături soluție de ninhidrină de 1% în acetonă de 95%. Conținutul eprubetei se agită și se încălzește pe baia de apă la temperatura de 70°C timp de 5 minute.

Teme pentru autopregătire

1. Obiectul biochimiei și importanța ei în medicina practică. Metodele de studiu biochimice.
2. Particularitățile materiei vii.
3. Proprietățile generale ale biomoleculilor.
4. Rolul biologic al proteinelor.
5. Structura și clasificarea aminoacizilor; tipul de legătură în molecula proteică.
6. Teoria polipeptidică a structurii proteinelor, esența ei și dovezile experimentale.
7. Notarea și citirea aminoacizilor în peptide și proteine. Aminoacizii «N» și «C» terminali.
8. Principiul reacțiilor de culoare ale proteinelor și aminoacizilor.

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. Scrieți formulele aminoacizilor care sunt derivați ai: a) acidului propionic; b) acidului butiric; c) acidului valerianic.
2. Scrieți formulele aminoacizilor: a) nepolari hidrofobi; b) nepolari hidrofilii; c) aminoacizilor cu proprietăți acide și bazice.
3. Scrieți și citiți tripeptidele: a) His-Fen-Cis; b) Tyr-Pro-Arg. Care din reacțiile de culoare efectuate vor fi pozitive și care negative?
4. Scrieți tetrapeptida la care aminoacidul N-terminal să fie prezentat prin Trp, iar C-terminal – prin Met. Citiți peptida scrisă.
5. Scrieți cantitatea maximă de tripeptide care pot fi compuse din trei aminoacizi indicați: Gli, Ala, Ser - cu condiția că fiecare aminoacid poate să ocupe oricare din cele trei poziții și că fiecare aminoacid poate fi folosit numai o singură dată (pentru scrierea peptidelor de folosit indicarea prescurtată a aminoacizilor - prin trei litere). De exemplu, Gli-Ala-Ser; Ser-Gli-Ala; Ala-Ala-Gli etc.
6. Se poate considera ca compusul cercetat este o peptidă, dacă reacția cu ninhidrină este negativă, iar reacția biuretică - pozitivă?
7. Reacția Fol cu lichidul biologic este pozitivă. Se poate afirma că substanța este o proteină?
8. Putem identifica prezența aminoacizilor liberi în soluție având la dispoziție numai reactivi pentru proba cu ninhidrină? Motivați răspunsul.
9. Cum se poate stabili încheierea hidrolizei proteinei cu ajutorul reacției biuretice? Ce culoare va apărea și pe baza cărui compus?
10. Ce mediu se va crea la dizolvarea în apă a următoarelor tripeptide: a) Ala-Ser-Cis; b) Arg-His-Lyz; c) Glu-Cis-Asp. Scrieți grupele funcționale ale radicalilor aminoacizilor care determină pH-ul mediului. În ce mediu se va afla punctul izoelectric al acestor peptide?
11. Amestecul de glicină, alanină, acid glutamic, lizină, arginină și serină a fost supus electroforezei la pH 6,0. Răspundeți la următoarele întrebări și motivați răspunsul: Care din aminoacizi vor migra spre catod? Care spre anod? Care vor rămâne la locul de start?
12. În ce direcție va migra histidina supusă electroforezei la folosirea soluției tampon cu diferite valori ale pH-ului: a) pH = 4,0. b) pH=12,0. Scrieți formula aminoacidului și motivați răspunsul.

13. Scrieți o tripeptidă al cărei punct izoelectric se va afla în mediu alcalin. Motivați răspunsul.

14. Scrieți o tripeptidă (de scris formulele aminoacizilor) al cărei punct izoelectric se va afla în mediu acid.

TEMA 2

Structura chimică și rolul biologic al proteinelor

Experiența 1. Identificarea aminoacizilor prin metoda cromatografiei pe hîrtie.

Principiul metodei. Metoda se bazează pe diferența coeficientului de repartiție a aminoacizilor în apă și solvent organic (butanol), care nu se amestecă cu apa. Viteza migrării aminoacizilor pe hîrtie este direct proporțională cu gradul de dizolvare în butanol.

Mod de lucru. Pe linia de start a benzii de hîrtie cromatografică cu ajutorul unui capilar se aplică o picătură mică (diametrul nu mai mare de 5 mm) de hidrolizat proteic sau amestec de aminoacizi. După uscare la aer (fixare) banda se introduce în vasul cu amestecul de apă-butanol, astfel, încît lichidul să ajungă numai pînă la linia de start (2–3 mm). Cu ajutorul dopului, banda se fixează vertical fără să se atingă de pereții vasului. După 1,5 ore de expunere la temperatura camerei, banda se scoate din vas, se notează cu un creion simplu hotarul solventului și se usucă în termostat (10 minute la temperatura de 70–100°C). Apoi banda se trece prin soluție de ninhidrină 0,1–0,2% și din nou se usucă în termostat la temperatura de 100°C. Pe cromatogramă apar unele pete galbene sau violete localizate la diferite distanțe de linia de start. Cu ajutorul riglei se măsoară următoarele distanțe:

1. De la linia de start pînă la centrul fiecărei pete (a);
2. De la linia de start pînă la hotarul solventului (b). Raportul dintre distanțele parcurse de aminoacid (a) și de solvent (b) poartă denumirea de *coeficient de repartiție* (R), specific pentru fiecare aminoacid în condiții standard.

Importanța clinico-diagnostică. Metoda permite determinarea calitativă și cantitativă a aminoacizilor în obiectele biologice ceea ce are o importanță deosebită în studierea metabolismului proteic. În diferite afecțiuni ale ficatului, rinichilor și altor organe se constată modificarea conținutului aminoacizilor în serul sanguin.

Experiența 2. Reacția biuretică (Piotrovschi).

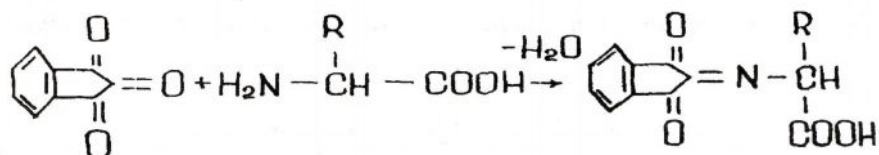
Principiul metodei. Legăturile peptidice (-NH-CO-) ale proteinelor în mediu alcalin reacționează cu CuSO_4 formând compuși complecși colorați în roșu-violet.

Mod de lucru. La 5 picături soluție de ovalbumină de 1% se adaugă 5 picături soluție de NaOH de 10% și 2 picături soluție de CuSO_4 de 1%. Eprubeta se agită. Apare culoarea violetă.

Notă: la concentrații majore în soluție ale histidinei, serinei, treoninei, asparaginei reacția biuretică este pozitivă. Ceilalți aminoacizi dau reacție negativă.

Experiența 3. Reacția cu ninhidrină.

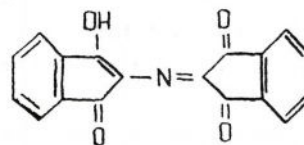
Principiul metodei. Ninhidrina reacționează cu grupările α -amino ale proteinelor și aminoacizilor cu formarea unui compus colorat în albastru-violet. Schema reacției:



Ninhidrină

Ca rezultat al reacțiilor de transpoziție, decarboxilare, scindare și condensare a produsului de reacție se obține un compus complex colorat în albastru-violet.

Mod de lucru. La 5 picături de soluție de proteină se adaugă 5 picături soluție ninhidrină de 0,5%. Conținutul eprubetei se fierbe 1-2 minute. Apare o culoare roz-violetă, care trece apoi în albastră.

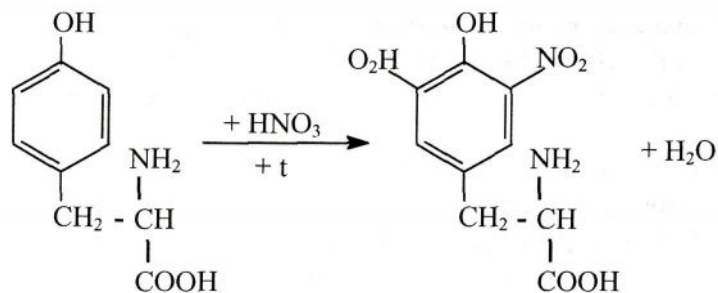


Experiența 4. Reacția xantoproteică (Mulder).

Principiul metodei. Aminoacizii aromatici la fierbere cu HNO_3 concentrat se supun nitrării. Ca rezultat soluția capătă o culoare galbenă care trece în oranj la adăugarea bazei. Schema reacției:

633728





Mod de lucru. La 5 picături soluție de ovalbumină se adaugă 3 picături de HNO_3 concentrat. În urma fierberii, conținutul eprubetei se colorează în galben. Dacă după răcire în eprubetă adăugăm 10–15 picături soluție de NaOH de 20%, culoarea soluției devine oranj ca rezultat al obținerii sării de sodiu a dinitrotirozinei.

Notă: reacție pozitivă dau compușii fenolici. Gelatina, salmina, clupeina (protamine) dau reacție negativă, cauzată de absența acizilor aromatici.

Teme pentru autopregătire

1. Nivelurile de organizare a moleculei proteice: structura primară, secundară, terțiară și cuaternară. Legăturile specifice acestor structuri. Foldingul și refoldingul proteinelor. Peptidele active.
2. Principiul metodelor de descifrare a structurii primare, secundare, terțiare și cuaternare a moleculei proteice.
3. Principiul metodelor de descifrare a structurii primare a moleculei proteice începînd de la aminoacidul: a) N-terminal; b) C-terminal și modul de realizare.
4. Clasificarea proteinelor.
5. Proteinele simple, proprietățile, particularitățile structurale.
6. Colagenul: particularitățile componenței aminoacidice și structurale.
7. Proteinele conjugate: nucleoproteidele, fosfoproteidele, lipoproteidele ș.a. Caracteristica generală.
8. Proteinele fixatoare de Ca^{2+} .

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. Care din aminoacizi participă la formarea legăturilor covalente în autostructurarea gradului trei de organizare a moleculei proteice (structurii terțiare)?

2. Cu care din metodele analitice folosite la lucrările de laborator se poate descifra componența aminoacidă a proteinei? (Trebuie să se țină cont de faptul că proteina pură trebuie obținută în prealabil și că metoda este folosită pentru prima oară).

3. Principiul chimic al metodelor de descifrare a structurii primare a proteinelor începînd: a) de la aminoacidul N-terminal; b) de la aminoacidul C-terminal; c) prin hidroliza prealabilă a proteinei și determinarea succesiunii fragmentelor polipeptidice în molecula proteică și al aminoacizilor în lanțuri.

TEMA 3

Proprietățile fizico-chimice ale proteinelor. Metodele de separare, purificare și determinare ale proteinelor

Experiența 1. *Dializa proteinelor.*

Dializă (din gr. *dialisis* - separare) se numește procesul de separare a substanțelor macromoleculare și soluțiilor coloidale de substanțe micromoleculare cu ajutorul membranelor semipermeabile (celofan, pergament, colodiu ș.a.). Din cauza diametrului mare, moleculele proteice, coloizii, substanțele macromoleculare nu pot trece prin porii acestor membrane, spre deosebire de substanțele micromoleculare și săruri.

Mod de lucru. 1. Într-un balon se toarnă 20 ml soluție de ovalbumină la care se adaugă 20 picături soluție saturată de sulfat de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2. Dintr-o foiță de celofan umezită în prealabil cu apă distilată, se confecționează un săculeț în care se toarnă conținutul balonului. Săculețul se introduce într-un pahar cu apă distilată și se cufundă astfel ca nivelul de lichid în săculeț să fie mai jos de nivelul apei în pahar.

3. Peste o oră de la începutul dializei, în două eprubete se iau câte 1 ml de lichid din pahar și se efectuează următoarele reacții: a) în una din eprubete se identifică prezența ionului de sulfat adăugînd 3–4 picături de soluție de BaCl_2 de 5% (dacă reacția este pozitivă, se observă apariția precipitatului

de BaSO_4 sub formă de turbureală de culoare albă); b) în a doua eprubetă se controlează prezența proteinei prin reacția biuretică.

4. Soluția din săculeț se toarnă într-o eprubetă și se verifică conținutul ei prin reacția biuretică. Ne convingem că prin membranele semipermeabile trec substanțele micromoleculare $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și nu pot trece proteinele. Dovadă servesc reacția pozitivă cu BaCl_2 în prima eprubetă și reacția negativă biuretică.

Experiența 2. Sedimentarea proteinelor.

Denaturarea proteinelor (precipitarea ireversibilă) se reduce la distrugerea structurii moleculei proteice (în afară de structura primară), însoțită și de pierderea proprietăților biologice. La sedimentarea ireversibilă proteinele suferă modificări profunde și nu pot fi solubilizate din nou. Din reacțiile de sedimentare ireversibile ale proteinelor fac parte: precipitarea proteinelor cu sărurile metalelor grele, acizi minerali și organici, reactivele alcaloide, precipitarea prin fierbere.

a. Precipitarea proteinelor cu sărurile metalelor grele.

Precipitarea proteinelor cu sărurile metalelor grele, spre deosebire de salifiere, are loc la concentrații mici. În reacție cu sărurile metalelor grele (Pb, Cu, Ag, Hg și al.) proteinele absorb aceste metale, formînd compuși complecși sau substanțe saliforme, care nu se mai solubilizează în prezența excesului acestor săruri (cu excepția AgKCO_3 și HgCl_2), dar se dizolvă în apă. Solubilizarea precipitatului proteic în exces de sare poartă denumirea de *peptizare adsorbivă*. Acest fenomen se datorează apariției sarcinii electrice pozitive în moleculele proteice. Capacitatea proteinelor de a lega trainic ionii metalelor grele sub formă de precipitate insolubile se folosește în practica medicală ca *antidot* în caz de intoxicație cu sărurile de mercur, cupru, plumb ș.a. De obicei, imediat după intoxicație, pînă cînd sărurile n-au reușit să se absoarbă, bolnavului i se administrează soluție proteică și se provoacă evacuarea (vomitatea) cu scopul de a înlătura toxina din organism.

Mod de lucru. În trei eprubete luăm cîte 5 picături de soluție de ovalbumină. În prima adăugăm 1–2 picături soluție de CuSO_4 ; în a doua – 2 picături de soluție de acetat de plumb; în a treia – 1–2 picături de soluție de nitrat de argint. În toate eprubetele apare un precipitat, care nu se dizolvă în apă. Dacă în prima eprubetă mai adăugăm 5–10 picături de soluție de sulfat de cupru, precipitatul se dizolvă. La adăugarea în eprubeta a treia a 5–10 picături de soluție de nitrat de argint precipitatul nu se solubilizează.

b. *Precipitarea proteinelor cu acizi minerali.*

Acizii minerali concentrați, cu excepția acidului ortofosforic, provoacă denaturarea proteinelor cu formarea de săruri complexe.

Mod de lucru. În două eprubete luăm câte 10 picături de acizi concentrați - azotic și sulfuric. Înclinând eprubetele la 45°, se toarnă pe pereții lor un volum egal de soluție proteică, evitând amestecarea lichidelor. La hotarul de separare a lichidelor apare un precipitat alb amorf în formă de inel. La adăugarea unui exces de acid în eprubetele respective observăm că precipitatul se dizolvă în acid sulfuric și nu se dizolvă în acid azotic.

Experiența 3. Separarea albuminelor și globulinelor din ovalbumină.

Proteinele din soluții pot fi precipitate prin salifiere (cu soluții de săruri neutre așa ca sulfatul de amoniu, clorura de sodiu ș.a.). Salifierea este un proces reversibil. Mecanismul precipitării proteinelor din soluții prin salifiere se reduce la deshidratarea macromoleculelor proteice și înlăturarea sarcinii electrice. Asupra vitezei de precipitare a proteinelor prin salifiere acționează un șir de factori așa ca hidrofilitatea proteinei, masa moleculară, sarcina electrică, de aceea salifierea diferitelor proteine are loc în concentrații diferite de săruri. De exemplu, albuminele se precipită în soluție saturată de sulfat de amoniu, iar globulinele – în soluție semisaturată de aceeași sare.

Mod de lucru. La 20 picături de soluție de ovalbumină nediluată se adaugă 20 picături de soluție saturată de sulfat de amoniu. Se obține o soluție semisaturată de sulfat de amoniu în care se precipită globulinele din ovalbumină. După 5 minute conținutul eprubetei se filtrează (hîrtia de filtru se umezește în prealabil cu apă distilată). Pe filtru se reține precipitatul de globuline, iar în filtrat trec albuminele. Pentru salifierea albuminelor, la filtrat se adaugă cristale de sulfat de amoniu pînă la saturație (pînă ce rata de sulfat de amoniu nu se dizolvă). Precipitatul apărut de albumine se filtrează, iar filtratul se verifică cu reacție biuretică. Reacția biuretică negativă indică lipsa proteinelor.

Experiența 4. Separarea proteinelor prin metoda electroforetică pe hîrtie.

Principiul metodei. Direcția migrării proteinelor în câmpul electric depinde de pH-ul mediului și proteinele, fiind electroliți amfoteri, în mediul acid posedă

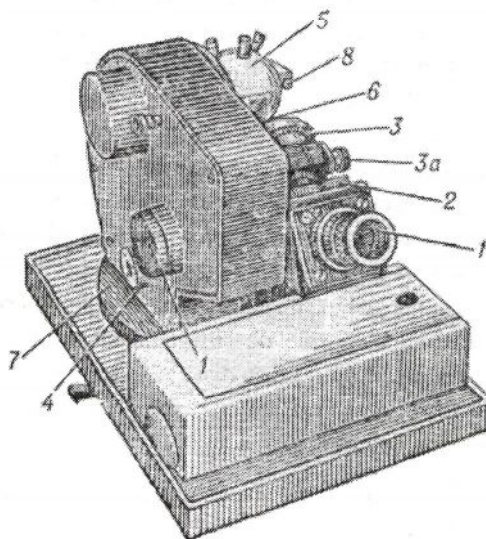
sarcină pozitivă și se mișcă spre catod, în mediul bazic sunt încărcate negativ și migrează spre anod. Separarea proteinelor din serul sanguin se efectuează folosind soluție tampon de pH-ul 8,6-8,9. În câmpul electric continuu proteinele serului sanguin, posedând sarcina electrică negativă la acest pH, migrează pe hîrtia umectată de soluția tampon spre anod cu o viteză care depinde de mărimea sarcinii electrice și de masa moleculară a particulelor. Mai repede migrează fracția de albumine, apoi globulinele, care se separă în fracții: α_1 , α_2 ; β și în final γ -globulinele.

Prin metoda electroforetică pe hîrtie proteinele serului sanguin se separă în 5-9 fracții care pot fi evaluate procentual.

Mod de lucru. Pe linia de start a unei fișii de hîrtie de electroforeză se aplică proba de ser sanguin cercetat. Linia de start se află aproape de catod, deoarece folosim soluție tampon cu pH-ul bazic în care proteinele manifestă sarcină negativă și se vor mișca spre anod. Timpul de expunere se apreciază experimental (fracțiile proteice trebuie să se separe, dar să nu dispară de pe hîrtia de electroforeză, trecînd în soluție tampon). Frațiile proteice de pe electroforegramă se fixează prin uscare și după aceea se "developează" (colorează) folosind un colorant specific pentru proteine.

Pentru a determina conținutul procentual al fracțiilor separate, electroforegrama se examinează prin densitometria sau colorimetria fiecărei fracțiuni. Suma extinției tuturor fracțiilor se va considera ca 100%, iar extinția fiecărei fracțiuni va indica conținutul de proteine.

Experiența 5. Determinarea concentrației de proteină totală în plasma (serul) sanguină prin metoda refractometrică.



Refractometrul IRF-22.

Principiul metodei. Metoda refractometrică se bazează pe capacitatea diferitelor medii de a reflecta în mod diferit razele de lumină ce le străbat. Raportul dintre sinusul unghiului de incidență ($\sin \alpha$) al razei și sinusul unghiului de refracție ($\sin \beta$) poartă denumirea de *indice de refracție*:

$$N = \sin \alpha / \sin \beta$$

Indicele de refracție al soluției depinde de cantitatea, mărimea și structura fizică a particulelor dizolvate, precum și de temperatura mediului. În serul sanguin indicele de refracție depinde în primul rând de cantitatea și calitatea proteinelor, sărurilor și a altor componente.

Indicele de refracție se determină cu ajutorul unui aparat special – refractometru – reprezentat în imaginea de mai sus.

Mod de lucru. Pe prisma de jos a camerei (5) refractometrului se aplică 2-3 picături de plasmă sau ser care se acoperă cu prisma de sus. Între prisme se formează un strat de soluție proteică. Cu ajutorul oglinzii, îndreptăm raza de lumină în ghișeul camerei. Uităndu-ne în ocular (1) și folosind maneta (3), înlăturăm culorile spectrului la linia de separare a câmpului optic în 2 câmpuri: unul luminat și altul întunecat. Cu maneta (7) instalăm punctul de încrucișare a liniilor care se observă în câmpul optic la linia de separare a câmpului. Indicele de refracție se citește după scara din partea stângă a câmpului.

Notă: Sensibilitatea metodei este de 0,5-1,0%, iar eroarea în limita de 10%.

Importanța clinico-diagnostică a metodei. Micșorarea conținutului de proteine totale serice (hipoproteinemie) se observă în inaniție proteică, tulburarea funcției protein-sintetice a ficatului, în urma pierderii proteinelor în hemoragii, exsudate masive în cavitățile seroase, în tulburarea filtrului renal (nefroze, amiloidoze).

Creșterea conținutului de proteină (hiperproteinemia) se observă comparativ rar – în boala mielomatoasă, macroglobulinemie (ca rezultat al sintezei proteinelor patologice – paraproteine), în excitația sistemului reticuloendotelial, în infecții și intoxicații. Hiperproteinemia relativă se observă în hemoconcentrație ca urmare a pierderii apei (diaree, sudorație intensă, poliurie, combustii).

Indicele de refracție	Concentrația proteinei în ser, %	Indicele de refracție	Concentrația proteinei în ser, %
1,33705	0,63	1,34575	3,68
1,33743	0,86	1,34612	5,90
1,33781	1,08	1,34650	6,12
1,33820	1,30	1,34687	6,34
1,33858	1,52	1,34724	6,55
1,33896	1,74	1,34761	6,77
1,33934	1,96	1,34798	6,98
1,33972	2,18	1,34836	7,20
1,34000	2,40	1,34873	7,42
1,34048	2,62	1,34910	7,63
1,34086	2,84	1,34947	7,85
1,34124	3,06	1,34984	8,06
1,34162	3,28	1,35021	8,28
1,34199	3,50	1,35058	8,49
1,34237	3,72	1,35095	8,71
1,34275	3,94	1,35132	8,92
1,34313	4,16	1,35169	9,14
1,34350	4,38	1,35205	9,35
1,34388	4,60	1,35242	9,57
1,34426	4,81	1,35279	9,78
1,34463	5,03	1,35316	9,99
1,34500	5,25	1,35352	10,20
1,34537	5,47	1,35388	10,41

Experiența 6. Determinarea absorbanței soluției proteice.

Principiul metodei. Soluțiile proteice posedă absorbantă în limitele spectrului ultraviolet, determinată de prezența resturilor aminoacizilor fenilalanina, tirozina și triptofan. Fenilalanina și tirozina au absorbanta maximă la lungimea de undă 280 nm, iar triptofanul - 254 nm. Gradul de absorbantă la lungimile de undă indicate este direct proporțional conținutului de fenilalanină, tirozină și triptofan în molecula proteinei.

Mod de lucru. Etapa 1. Pentru analiză se folosește soluția fracțiunii globulinice a ovalbuminei, căpătată după sedimentarea albuminelor în experiența 3 de la tema 3 și purificată de sulfat de amoniu prin dializă în experiența 1 de la aceeași temă.

Soluția dată se toarnă în cuva de 1 cm și se fac măsurări la spectrofotometrul automat Specord UV-vis în zona ultravioletă a spectrului (180-340 nm). După graficul obținut se determină unitățile densității optice D (absorbției luminei) a soluției cercetate de globulină corespunzătoare lungimilor de undă de 254 și 280 nm și se compară datele obținute. În baza rezultatelor înregistrate se trag concluzii despre raportul fenilalaninei, tirozinei și triptofanului în globulinele din ovalbumină.

E t a p a 2. Se determină cantitatea de fenilalanină, tirozină și triptofan cu ajutorul reacției Pauli și Adamkiewick-Hopkins, cum a fost descris în experiențele 4 și 5 (tema 1). După apariția în timpul reacțiilor date a colorației specifice probele se colorimetrează. Concentrația aminoacizilor fenilalanina, tirozina și triptofanul se determină după graficul de calibrare.

Se determina raportul dintre concentrațiile de fenilalanină, tirozină și triptofan. Raportul obținut se compară cu raportul absorbției de la etapa 1.

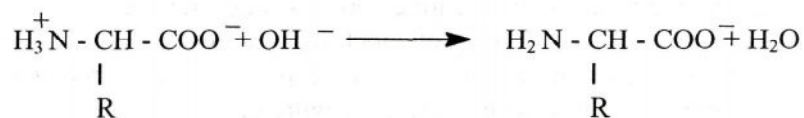
Experiența 7. Determinarea punctului izoelectric.

Principiul metodei. Sarcina electrică a unei proteine în soluție este determinată de numărul și gradul de disociere al grupărilor acide sau bazice ale aminoacizilor din componența ei. În funcție de pH-ul mediului, aminoacizii se comportă ca acizi sau ca baze. În funcție de mediu, au loc următoarele reacții:

- în mediu acid:



- în mediu alcalin:



Astfel la trecerea curentului electric prin soluție, aminoacizii vor migra în mediu acid spre catod, iar în mediu alcalin – spre anod. La o anumită valoare a pH-ului, migrarea în câmpul electric nu are loc, aminoacidul găsindu-se sub

formă de dipol. În această stare se exercită forțe de atracție reciprocă între grupările COO^- și NH_3^+ . Are loc o aglomerare a moleculelor din soluție și solubilitatea devine minimă. Valoarea pHi-ului la care migrarea proteinelor sau a aminoacizilor într-un câmp electric este nulă, poartă denumirea de *punct izoelectric* (pHi). El are valori diferite pentru fiecare aminoacid sau proteină.

Acizii monoaminomonocarboxilici au pHi-ul în jurul valorii 6, deoarece disocierea grupării COOH este mai mare decât a grupării NH_2 .

Acizii monoaminodicarboxilici (acid aspartic și glutamic) au pHi-ul în zonă acidă 3,0-3,2 datorită celor două grupări carboxilice, pe când cei diaminomonocarboxilici au pHi-ul situat în mediu alcalin.

Reactivile: Soluție acetat de sodiu de 0,1 N; soluție acid acetic de 0,1 N; soluție gelatină de 1%; alcool metilic.

Mod de lucru. Se iau 6 eprubete și în fiecare se adaugă următoarele soluții după cum este arătat în tabelul de la p. 28.

După adăugarea alcoolului metilic, eprubetele se agită și se lasă pentru o jumătate de oră. În eprubeta a 4-a apare o turbureală intensă. Deci în această eprubetă s-a realizat pHi, care este de 4,7.

Teme pentru autopregătire

1. Proprietățile fizico-chimice ale proteinelor: masa moleculară, solubilitatea, proprietățile amfotere.
2. Proprietățile hidrofile ale proteinelor în funcție de particularitățile structurale și aminoacizii constituienți.
3. Factorii de stabilizare în soluție a substanțelor coloidale.
4. Sarcina electrică a proteinelor. Punctul și starea izoelectrică.
5. Denaturarea proteinelor, agenții ce provoacă denaturarea. Modificările structurale ale proteinei la denaturare.
6. Coagularea proteinelor. Factorii care previn coagularea. De ce denaturarea este deseori însoțită de coagulare?
7. Starea soluțiilor coloidale: sol, gel, xerogel. Exemple.
8. Metodele de studiere a componenței calitative și cantitative a proteinelor: a) hidroliza; b) cromatografia; c) electroforeza; d) salifierea; e) dializa.

Reactivii care se adaugă (ml)	Numărul eprubetelor:					
	1	2	3	4	5	6
Acetat de sodiu de 0,1 N	2	2	2	2	2	1,2
Acid acetic de 0,1 N	0,25	0,5	1	2	4	4,8
Apă distilată	3,75	3,5	3	2	-	-
Gelatină	2	2	2	2	2	2
pHi-ul ce se obține	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Alcool metilic	8	8	8	8	8	8
Tulbureală			++	+++		

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. Aveți la dispoziție un șir de eprubete cu soluții coloidale. Cum se poate identifica în care din eprubete se conține proteină și în care alte substanțe coloidale?
2. Cum explicați faptul că într-un mediu puternic bazic sau acid proteinele se denaturează dar nu se precipită?
3. De ce unele produse infectate sau toxice pot fi folosite în alimentație după o expunere termică (fierbere), iar altele nu? Motivați răspunsul.
4. Proteina se precipită la adăugarea etanolului. Precipitatul maxim se observă în eprubeta cu pH-ul 9,1. Care aminoacizi predomină în componența proteinei?
5. Cum se poate separa din amestec proteina cu punctul izoelectric cunoscut având la dispoziție acizi, baze, săruri, etanol?
6. Ce transformări suferă molecula proteică la: a) hidroliză; b) salifiere; c) denaturare. Care niveluri de structură se modifică și care din aceste procese sunt reversibile și care ireversibile?
7. Cum explicați acțiunea denaturantă asupra proteinelor a:
 - a) alcoolului etilic;
 - b) acetonei, sărurilor neutre, iodului?
8. De ce punctul izoelectric al majorității proteinelor se găsește într-un mediu slab acid ($\text{pH} = 4,5-6,0$), iar a protaminelor și histonelor – în mediu slab alcalin?

9. Spre care electrod vor migra histonele (linia de start se află la mijlocul benzei electroforetice) când vom folosi soluțiile tampon cu: a) $\text{pH} = 4,0$
b) $\text{pH} = 9,0$? Motivați răspunsul.
10. Cum putem trece soluția coloidală din gel în sol și invers? Motivați răspunsul.
11. Ce numim xerogel? Enumerați exemple de xerogel.
12. Principiul metodei de secare liofilă a soluțiilor coloidale; utilizarea acestei metode în industria medicală și economia națională. Prioritatea acestei metode la prepararea medicamentelor de origine proteică.
13. Cu ajutorul căror metode este posibilă separarea soluțiilor proteice de substanțele micromoleculare? Care din aceste metode au fost folosite la lucrările de laborator și în ce constă principiul lor?
14. Calculați masa moleculară a proteinei dacă se știe că ea conține 0,34% fier cu masa atomică de 56,0.
15. Calculați masa moleculară a proteinei care conține 0,6% triptofan cu masa moleculară de 204.
16. Argumentați biologic și biochimic prelucrarea cîmpului pentru operații și injecții cu alcool etilic, soluție de iod.
17. Argumentați utilizarea proteinelor laptelui și ouălor în intoxicațiile cu săruri ale metalelor grele.

Partea a II-a. Enzimele

Enzimele (sau fermenții) sunt catalizatori biologici de natură proteică care în anumite condiții accelerează reacțiile chimice atât în țesuturile organismului, cât și în exteriorul lui.

După structura chimică, enzimele sunt proteine simple sau conjugate. Enzimele - proteine simple se mai numesc monocomponente. Din această grupă fac parte hidrolazele: pepsina, tripsina, lipaza, amilaza, zaharaza ș. a.

Enzimele - proteine conjugate, mai poartă denumirea de bicomponente, deoarece constau din două componente: partea proteică - *apoenzimă* și partea neproteică - *coenzimă*. Multe coenzime (TDP, NAD, FAD, CoA și al.) sunt derivați ai vitaminelor. Coenzime pot fi și unii ioni metalici (Ca, Zn, Mn, Mo ș. a.).

La interacțiunea cu substratul nu participă întreaga moleculă de enzimă, ci numai un anumit sector al ei - *centrul activ*. El asigură contactul și transformările ulterioare ale substratului și este format din diferite grupări funcționale: OH, SH, inelul imidazolic ș. a. În componența centrului activ al enzimelor bicomponente pot intra și coenzimele, ionii metalelor.

Multe enzime pe lângă centrul activ, posedă și *centrul alosteric* sau *centrul de reglare*. Substanțele care se combină cu centrul alosteric al enzimei și modifică activitatea ei poartă denumirea de *efectori alosterici* (inhibitori sau activatori). Sub acțiunea efectorilor se modifică configurația moleculei de enzimă și simultan conformația centrului activ, care la rândul său posedă proprietatea de a reacționa cu substratul. Deci efectorii alosterici realizează reglarea metabolismului.

Actualmente sunt cunoscute circa 2000 de enzime. Conform clasificării unice mondiale, enzimele se împart în șase clase: oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze și ligaze sau sintetaze. Denumirea claselor provine de la tipul reacțiilor catalizate de enzimele corespunzătoare. Fiecare enzimă este numerotată printr-un cod constituit din patru cifre, separate prin punct și dispuse conform următoarelor principii: prima cifră indică clasa, a doua - subclasa, a treia - subsubclasa, a patra - numărul de serie al enzimei în subsubclasă. De exemplu, succinatdehidrogenaza prezintă numărul de cod EC 1.3.99.1., aspartataminotransferaza - EC 2.6.6.1.1, lipaza - EC 3.1.1.3.

Unele enzime au câteva forme moleculare, formînd așa-numitele izoenzime sau izozime. Izozimele posedă o specificitate identică, dar se deosebesc după proprietățile fizico-chimice și imunologice ca rezultat al unei deosebiri în componența aminoacidică a apoenzimei. Izoforme au astfel de enzime ca lactatdehidrogenaza, malatdehidrogenaza, creatinkinaza ș. a., în total circa 100 de enzime. Raportul dintre formele de izozime în țesuturi depinde de vîrstă, starea fiziologică a organismului ș. a.

Enzimele, în calitate de catalizatori biologici, posedă anumite proprietăți și anume: a) activitate catalitică mare; b) specificitate; c) termolabilitate; d) dependența activității enzimei de pH; e) modificarea activității în prezența activatorilor și inhibitorilor. Proprietățile enzimelor enumerate mai sus indică natura proteică a enzimelor.

Întrucât în țesuturi și lichidele biologice ale organismului enzimele se conțin în concentrații mici determinarea lor este dificilă. Pentru evidențierea lor sunt folosite de obicei metode indirecte. Prezența și activitatea enzimei se apreciază după acțiunea efectuată de enzimă, adică după concentrația produselor de reacție. Prezența și activitatea lipazei se apreciază după cantitatea de acizi grași liberi obținuți ca rezultat al scindării grăsimilor; a amilazei (sanguine, urinare) - după cantitatea de amidon scindată într-o anumită perioadă de timp.

Viteza reacției enzimatică depinde de raportul dintre concentrațiile enzimei și substratului. În condiții normale, în mediul extracelular, sînge, lichide biologice enzimele se conțin în cantități mici.

În diferite stări patologice, în urma lezării organelor și celulelor, conținutul intracelular ajunge în sînge și alte lichide biologice provocînd creșterea conținutului de enzime. Modificarea activității enzimatică din sînge și alte lichide biologice servește ca indicator important în diagnosticul bolilor și se folosește pe larg în medicina practică.

TEMA 4

Natura chimică și structura enzimelor.

Mecanismul acțiunii enzimatică. Clasificarea enzimelor.

Vitaminele în calitate de coenzime

Experiența 1. Demonstrarea prezenței legăturilor peptidice în molecula enzimei tripsina.

Se realizează prin intermediul reacției biuretice. Principiul metodei și mersul lucrării este descris în lucrarea practică 2, experiența 2.

Experiența 2. Demonstrarea prezenței aminoacizilor în molecula enzimei tripsina.

Se efectuează prin intermediul reacțiilor ninhidrinice, xantoproteice și reacției Fol. Principiul metodei și mersul lucrării sunt descrise în lucrarea practică 1, experiența 1 și în lucrarea practică 2, experiența 3 și 4.

Experiența 3. Identificarea vitaminei B₁ cu ajutorul diazoreacției.

Vitamina B₁ conține inelul pirimidinic și tiazolic și este numită tiamină, deoarece conține sulf și gruparea amino. Dacă hidrogenul din grupa alcoolică primară este substituit cu restul de pirofosfat (difosfat), atunci se obține tiaminpirofosfat (TPP) sau tiamindifosfat (TDP) care servesc drept coenzimă. Această coenzimă se sintetizează în ficat în urma transferului restului de pirofosfat (difosfat) de la ATP, în alte țesuturi de la TTP. TPP (TDP) participă la reacțiile de decarboxilare a α -cetoacizilor și în reacția transcetolazică fiind partea structurală a enzimelor care participă la metabolismul glucidelor.

Carența de vitamină B₁ în alimente provoacă dereglări ale sistemului nervos periferic cunoscute sub denumirea de beri-beri sau polinevrită. În acest caz în organism crește concentrația de acid piruvic și alți α -cetoacizi.

Principiul metodei. Tiamina în mediu alcalin formează cu diazoreactivul un compus complex de culoare oranj.

Mod de lucru. La 5 picături de diazoreactiv, care constă din volume egale de soluție de acid sulfanilic de 1% și soluție de nitrit de sodiu de 5%, se adaugă 1–2 picături soluție de tiamina de 5%. Înclinând eprubetă se picură atent pe pereții ei 5–7 picături de bicarbonat de sodiu de 10%. La hotarul dintre lichide apare un inel colorat în oranj.

Experiența 4. Identificarea vitaminei B₂.

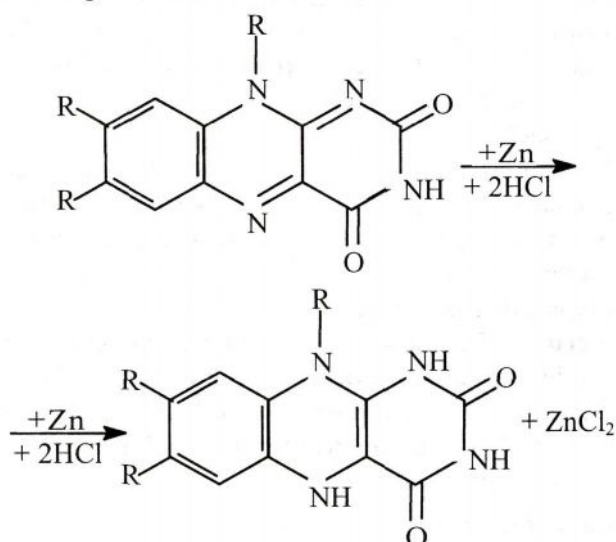
Vitamina B₂, sau riboflavina, constă din inelul izoaloxazinic și polialcoolul ribitol. Ea este partea componentă a grupării prostetice a enzimelor flavinice (flavoproteinelor), participând la sinteza flavinadeninucleotidului (FAD) și flavinmononucleotidului (FMN). Flavoproteinele participă la reacțiile de dehidrogenare (scindarea protonilor și electronilor de la anumite substraturi - substanțe care se oxidează și servesc ca donatori de hidrogen). Aceste enzime participă la oxidarea D-aminoacizilor, acizilor grași, NADH, în oxidarea biologică ș. a.

Acțiunea biologică a enzimelor flavinice depinde de prezența legăturilor duble în inelul izoaloxazinic: flavinenzima rupe de la molecula care se oxidează doi electroni și doi protoni, unindu-i la atomii de azot legați prin legături duble.

În carența de vitamină B₂ poate apărea cataracta (tulburarea cristalinului) și alte dereglări.

Principiul metodei. Forma oxidată a vitaminei B₂ reprezintă o substanță care la iradiere cu raze ultraviolete dă o fluorescență de culoare galbenă. Reacția de identificare a vitaminei B₂ este bazată pe proprietatea ei de a se reduce ușor. În formă oxidată vitamina B₂ are o culoare galbenă, iar la începutul reacției de reducere dă o culoare roză (se obțin derivați intermediari) care în cele din urmă se decolorează, deoarece forma redusă a vitaminei B₂ este incoloră.

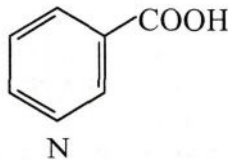
Reacția decurge conform schemei:



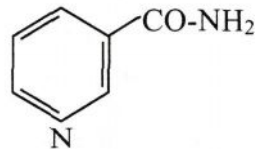
Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau 10 picături de soluție de vitamină B₂, se adaugă 5 picături de acid clorhidric concentrat și o granulă de zinc metallic. Se observă degajarea bulelor de hidrogen, lichidul galben se colorează treptat în roz, după ce se decolorează.

Experiența 5. Identificarea vitaminei PP.

Vitamina PP (din ital. *pelagre* – preventive) este un derivat al inelului piridinic. Activitate antipelagrosă, în afară de acidul nicotinic, posedă și amida lui.



Vitamina PP



Amida vitaminei PP

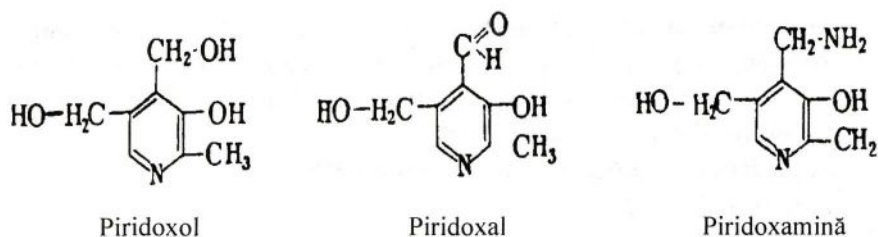
În organismul uman și animal, vitamina PP se află în forma conjugată cu proteinele. Din vitamina PP se obțin două coenzime - nicotinamadeninucleotida (NAD) și nicotinamadeninucleotidfosfat (NADP). Acestea sunt coenzime ale dehidrogenazelor care participă la multiple reacții de oxido-reducere. NAD⁺ și NADP⁺ adăuionează electroni și protoni de la substratele care se oxidează. Electronii și protonii, adăuionându-se la NAD⁺ și NADP⁺, reduc inelul piridinic.

Carența de vitamină PP în alimente provoacă boala pelagra.

Principiul metodei și modul de lucru. Într-o eprubetă se iau 20 picături de soluție de vitamină PP se agită și se încălzește pînă la fierbere; ca rezultat dispare turbureala și soluția devine transparentă. Se agită soluția de acetat de cupru de 5% și se adaugă 20 picături la soluție fierbinte de vitamină PP. Eprubeta se încălzește din nou pînă la fierbere și după aceea se răcește într-un jet de apă rece. La fundul eprubetei se depune un precipitat de culoare albastră de sare de cupru a acidului nicotinic.

Experiența 6. Identificarea vitaminei B₆.

Din grupul vitaminei B₆ fac parte piridoxolul, piridoxal și piridoxamina, derivați ai piridinei care poartă denumirea generală de piridoxină. Aceste trei substanțe posedă activitate de vitamină B₆.



În organism, fiecare din acești compuși poate fi fosforilat cu participarea ATP cu formare de coenzime - fosfopiridoxalul și fosfopiridoxamina. Aceste coenzime reprezintă componente ale enzimelor care participă la metabolismul proteic (reacțiile de transaminare și decarboxilare a aminoacizilor, reacțiile de desulfurare și dehidratare a aminoacizilor, reacțiile de sinteză a vitaminei PP din triptofan ș. a.)

În carența de vitamină B₆ în alimente, la animale se observă tulburarea metabolismului proteic; la oameni carența de vitamină B₆ se observă rar.

Principiul metodei. Vitamina B₆, reacționând cu clorura de fier, formează o sare complexă de tipul fenolatului de fier de culoare roșie.

Mod de lucru. La 5 picături soluție de vitamină B₆ de 1% se adaugă un volum egal soluție de clorură de fier de 1%. Amestecul se agită. Apare o colorație roșie.

Teme pentru autopregătire

1. Noțiune despre enzime, natura chimică și rolul biologic al enzimelor. Deosebiriile dintre acțiunea enzimelor și catalizatorilor nebiologici.
2. Dovezile naturii proteice a enzimelor. Structura enzimelor. Proenzimele (zimogenii). Noțiune despre centrul activ și centrul alosteric al enzimelor.
3. Izoenzimele și rolul lor.
4. Cofactorii enzimelor. Coenzimele și ionii metalici. Funcțiile de coenzime ale vitaminelor și microelementelor.
5. Natura chimică (structura) a vitaminelor B₁, B₂, B₆, PP CoA, biotina, acidul folic și rolul lor ca coenzime.
6. Mecanismul de acțiune al enzimelor. Centrul activ al enzimelor și rolul lui în formarea și transformarea complecșilor intermediari dintre enzimă și substrat. Rolul modificărilor conformaționale reciproce ale moleculei enzimei și substratului la favorizarea catalizei (reacției).

7. Nomenclatura (denumirea) și clasificarea enzimelor. Caracteristica generală a claselor și subclaselor principale de enzime. Numărul de cod al enzimei.

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. Prin care experiență și pe exemplul cărei enzime a fost demonstrată la lucrările de laborator: a) natura proteică a enzimelor; b) deosebirea în acțiunea enzimelor și catalizatorilor nebiologici.
2. Care este rolul vitaminelor în metabolism și activitatea vitală a organismelor?
3. Ce modificări metabolice ilustrează stările de hipo- și avitaminoze?
4. Centrele active pot fi separate din enzime? Motivați răspunsul.
5. Care-s deosebirile în componența centrelor active ale enzimelor simple (monocomponente) și a celor conjugate?
6. Toate enzimele posedă centre alosterice? Ce denumire mai poartă aceste enzime? Care este mecanismul lor de reglare?
7. Determinați clasa, subclasa și subsubclasa următoarelor enzime: a) amilazei; b) pepsinei; c) lipazei.
8. Scrieți nomenclatura (denumirea) claselor de enzime și semnați ordinea claselor conform Comisiei internaționale pentru enzime din cadrul I.U.B. (EC).

TEMA 5

Influența factorilor de mediu asupra activității enzimatică. Determinarea activității enzimatică. Efectorii enzimatici

Experiența 1. Inhibiția competitivă (concurrentă) a enzimelor (pe exemplul succinatdehidrogenazei).

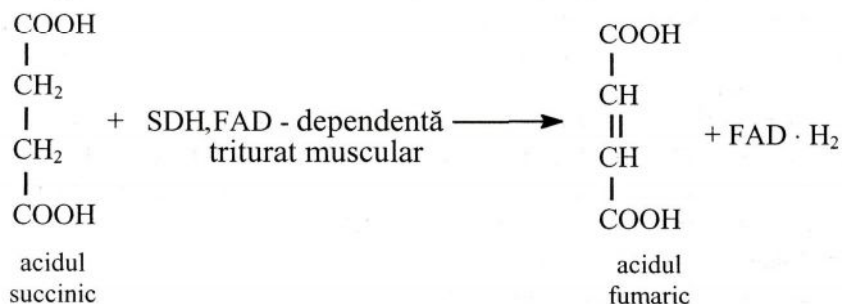
Principiul metodei. Succinatdehidrogenaza (SDH) (EC 1.3.99.2.) catalizează oxidarea (dehidrogenarea) acidului succinic și transformarea lui în acid fumaric. FAD-ul servește ca coenzimă a SDH. După natura chimică această enzimă face parte din grupa metaloflavoproteidelor. Activitatea ei depinde de prezența în componența centrului activ a grupărilor sulfhidrilice libere - SH și a ionilor de Fe^{2+} .

Ca sursă de enzimă este folosit omogenatul țesutului muscular spălat în prealabil, în care SDH este strâns legată ca componentă structurală a

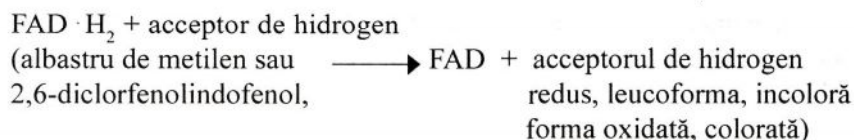
membranei interne a mitocondriilor celulare. Acțiunea enzimei se determină în condiții anaerobe prin adăugarea soluției de acid succinic ca substrat, albastrului de metilen sau 2,6-diclorfenol-indofenolului ca acceptori de hidrogen, care, reducându-se, se transformă în leucoformă incoloră.

Reacția decurge conform schemei:

Etapa I:



Etapa II:



Decolorarea amestecului (enzimă, substrat și acceptor) servește ca dovadă a activității SDH. Inhibitor competitiv al SDH este acidul malonic $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, analogul structural al acidului succinic. Mecanismul de inhibiție se explică prin aceea, că centrul activ al SDH se combină mai activ cu acidul malonic conținut într-o concentrație mai mare, dar care nu se oxidează și simultan împiedică interacțiunea enzimei specifice cu substratul respectiv. De aceea, dacă în eprubeta, în care pe lângă reactivii conținuți în eprubeta de experiență se adăugă acidul malonic, lichidul nu se decolorează (reacția de oxido-reducere este blocată, nu enzima).

Mod de lucru. Un gram de țesut muscular se mărunțește cu foarfecele și se triturează în mojar timp de 1 minut cu o cantitate mică de apă (2–3 ml). Trituratul muscular se transferă apoi pe un strat dublu

de tifon instalat pe pîlnie și se spală cu 15–20 ml de apă. Tifonul cu triturat se stoarce, iar trituratul se transferă pe hîrtie de filtru și se usucă. În 3 eprubete se măsoară cîte 3 ml de soluție tampon fosfat (pH=7,4). În fiecare eprubetă se introduc aproximativ cîte 0,1 g de triturat muscular (uscat în prealabil pe hîrtie de filtru). După aceasta, în prima eprubetă (de experiență) se adaugă 5 picături soluție de acid succinic de 3% și 5 picături soluție de NaOH de 0,1 N (pentru neutralizare). În eprubeta a doua (de control) se adaugă 10 picături de apă distilată; în eprubeta a treia – 5 picături soluție de acid succinic de 3%, 5 picături soluție de acid malonic de 3% și 5 picături soluție de NaOH de 0,1 N. Apoi în toate eprubetele se adaugă cîte 1 ml soluție de 2,6-diclorfenolindofenol de 0,001 N. Eprubetele se agită și se introduc în termostat sau baia de apă la temperatura de 37°C pentru 40 de minute. După expirarea timpului, se observă că lichidul din prima eprubetă (de experiență) se decolorează parțial. Se compară colorația primei eprubete cu eprubeta a doua (de control), în care se conține numai enzimă, și eprubeta a treia care conține enzimă, substrat, inhibitorul și acceptorul de hidrogen.

Trageți concluzii referitor la rezultatele obținute.

Experiența 2. Studiarea proprietăților generale ale enzimelor (specificitatea, termolabilitatea) pe exemplul succinatdehidrogenazei.

Principiul metodei: Rămîne același ca și în experiența 1.

a) *Specificitatea*

Mod de lucru. În trei eprubete se introduc cîte 2 ml de homogenat muscular și se adaugă: în I – 0,4 ml de apă distilată, în a II-a – 0,2 ml soluție de malat de 1% și 0,2 ml de apă distilată, în a III-a – 0,4 ml soluție de malat de 1%. În toate trei eprubete se adaugă cîte 1 ml soluție de acid succinic de 1%, 2-3 picături soluție de albastru de metilen de 1% și după agitare cîte 3-4 picături de ulei de vazelină conform tabelului.

Eprubetele se introduc în baia de apă la temperatura de 38°C. Peste 5-10 minute eprubetele se scot și se observă schimbarea culorii.

Conținutul eprubetelor	Numărul eprubetei		
	I	II	III
Homogenat muscular	2 ml	2 ml	2 ml
Apă distilată	1 ml	-	-
Soluție de malat de 1%		-	1 ml
Soluție de succinat de 1%	-	1 ml	-
Soluție de albastru de metilen de 1%	3 picături	3 picături	3 picături
Ulei de vazelină	3 picături	3 picături	3 picături

Rezultatele experienței se introduc în tabel și se trag concluziile necesare.

Schimbarea culorii	Numărul eprubetei		
	I	II	III

b) Termolabilitatea succinatdehidrogenazei

Principiul metodei. Metoda se bazează pe reducerea ferocianurii de potasiu ($K_3[Fe(CN)_6]$), care are o culoare galbenă, pînă la ($K_4[Fe(CN)_6]$), care este incolor, de către succinat în prezența succinatdehidrogenazei. Activitatea enzimei este proporțională cu cantitatea de ferocianură redusă.

Reacția are loc după următoarea schemă:



Mod de lucru. În eprubete de centrifugat se introduc cîte 1 ml de soluție tampon fosfat 0,1M pH 7,4 și 0,1 ml de soluții de acid succinic, EDTA, azotură de sodiu și apă distilată. La probe se adaugă cîte 0,5 ml de suspensie de mitocondrii, obținută din țesutul cercetat, și se lasă la temperatura camerei timp de 5 minute pentru inhibarea citocromoxidazei de către azidul de sodiu. Pentru declansarea reacției se adaugă 0,1 ml soluție de ferocianură de potasiu. Probele se incubează 10-15 minute la temperatura de 10°, 20° 30°, 40° și 50°C. După incubare, reacția este stopată prin cufundarea probelor în gheață și adăugarea a cîte 2 ml de acid tricloracetic de 20%. În probele de control, care conțin toate componentele amestecului de incubare, acidul tricloracetic se adaugă înaintea suspensiei de mitocondrii. Astfel, în probele de control succinatdehidrogenaza este complet denaturată din momentul

începerii incubării din care cauză reducerea specifică a ferocianurii de către succinat nu are loc.

După stoparea reacției și răcire, probele se centrifughează la 2000 turații pe minut timp de 15 minute pentru sedimentarea completă a proteinelor mitocondriale denaturate. Probele se fotometrează la spectrofotometru (lungimea de undă 420 nm) contra probei de control.

Activitatea enzimei se determină conform curbei de calibrare.

În baza datelor obținute se construiește graficul de calibrare a dependenței activității succinatdehidrogenazei de temperatură și se trag concluzii.

Experiența 3. Acțiunea pH-ului asupra activității succinatdehidrogenazei.

Mod de lucru: În 3 eprubete de centrifugat se introduc câte 1 ml soluție tampon fosfat cu pH 5,5; pH 7,4 și pH 9,18; 0,1 ml soluții de acid succinic, EDTA, azid de sodiu și apă distilată. La probe se adaugă câte 0,5 ml de suspensie de mitocondrii, obținută din țesutul cercetat, și probele se incubează la temperatura camerei timp de 5 minute pentru inhibarea citocromoxidazei cu azid de sodiu. Reacția se declanșează prin adăugarea a 0,1 ml soluție de ferocianură de potasiu. Probele se incubează 10-15 minute la temperatura de 37°C.

După incubare, reacția este stopată prin cufundarea probelor în gheață și adăugarea a câte 2 ml acid tricloracetic de 20%. În probele de control, care conțin toate componentele amestecului de incubare, acidul tricloracetic se adaugă înaintea suspensiei de mitocondrii. În așa fel, succinatdehidrogenaza în probele de control din momentul începerii incubării este complet denaturată și reducerea specifică a ferocianurii de către succinat nu are loc.

După stoparea reacției și răcire, probele se centrifughează la 2000 turații pe minut timp de 15 minute pentru sedimentarea completă a proteinelor mitocondriale denaturate. Probele se fotometrează la spectrofotometru (lungimea de undă 420 nm) contra probei de control.

Activitatea enzimei se determină conform curbei de calibrare.

În baza rezultatelor obținute se construiește graficul de calibrare a dependenței activității succinatdehidrogenazei de pH-ul mediului.

Teme pentru autopregătire

1. Proprietățile generale ale enzimelor (termolabilitatea, specificitatea), acțiunea pH-ului asupra activității enzimaticice.
2. Activarea și inhibarea enzimelor:
 - a) mecanismele de activare (proteoliza parțială, activarea alosterică, autostructurarea cuaternară, fosforilarea și defosforilarea, reactivarea).
 - b) mecanismele de inhibiție (specifică și nespecifică, reversibilă și ireversibilă, alosterică și competitivă).
3. Organizarea enzimelor în celulă (ansamblurile enzimaticice, compartimentalizarea). Reglarea activității enzimaticice în celulă. Importanța principiului de retroinhibiție.
4. Deosebiri în componența enzimatică a organelor și țesuturilor. Enzimele organospecifice. Modificarea activității enzimaticice în diferite afecțiuni (enzimodiagnosticul).
5. Metodele de obținere și purificare ale enzimelor. Cromatografia de afinitate.
6. Utilizarea enzimelor în practica medicală. Întrebuințarea enzimelor imobilizate în medicină.
7. Unitățile de activitate ale enzimelor.
8. Metodele de determinare a activității enzimelor.

Întrebări pentru autocontrol și situație de problemă

1. Cum putem demonstra că specificitatea enzimelor este determinată de partea proteică (apoenzimă)? Exemplificați răspunsul.
2. Cum se explică varietatea spectrelor izoenzimaticice ale diferitelor organe?
3. Numiți căile și tipurile de activare și inhibare ale enzimelor.
4. Cu care experiență și pe exemplul cărei enzime a fost demonstrată la lucrările practice; a) acțiunea temperaturii și pH-ului asupra activității enzimaticice; b) specificitatea acțiunii enzimaticice; c) inhibiția competitivă (concurrentă)? Principiul acestor lucrări, reacțiile și metaboliții, după care se apreciază acțiunea enzimelor.

5. Care din metodele de separare și purificare ale enzimelor este mai rapidă, monoetapică și mai economică? Denumirea și principiul acestei metode.

6. În ce constă importanța clinică a determinării activității enzimelor în lichidele biologice? În patologie are loc reducerea sau sporirea activității enzimelor? Motivați răspunsul.

7. În pancreas se sintetizează enzime care participă la procesul de digestie. Prin metoda de uscare liofilă și triturare ulterioară se obține preparatul pancreatina. Cum vom proceda pentru identificarea enzimelor care se conțin în acest preparat?