

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΙΙ

A. ENZYMOLOGIA

- Ποσοτικός προσδιορισμός της ενζυμικής δράσης
- Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων
Μελέτη της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης
Μελέτη της επίδρασης παραγόντων στην κινητική ενζυμικών αντιδράσεων
Η δράση της όξινης φωσφατάσης σε υπόστρωμα π-νιτρο-φαινυλο-φωσφορικό εστέρα
απουσία και παρουσία αναστολέων

B. ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

- Βιολογικά δείγματα (παραλαβή / διατήρηση)
- Χημικοί / ενζυμικοί προσδιορισμοί ενώσεων με κλινική σημασία
πρωτεϊνών, ουρίας, γλυκόζης, TG, χοληστερόλης

Ενζυμολογία

Για την ύπαρξη και τη διατήρηση της ζωής είναι απαραίτητο ένας οργανισμός να έχει την ικανότητα να:

1. αυτο-αντιγράφεται
2. καταλύει χημικές αντιδράσεις αποτελεσματικά και επιλεκτικά

για τη δεύτερη προϋπόθεση απαραίτητοι είναι οι βιολογικοί καταλύτες (βιοκαταλύτες) => *τα ένζυμα*

Η μελέτη των ενζύμων = **ENZYMΟΛΟΓΙΑ**

Η σημασία των ενζύμων στον οργανισμό

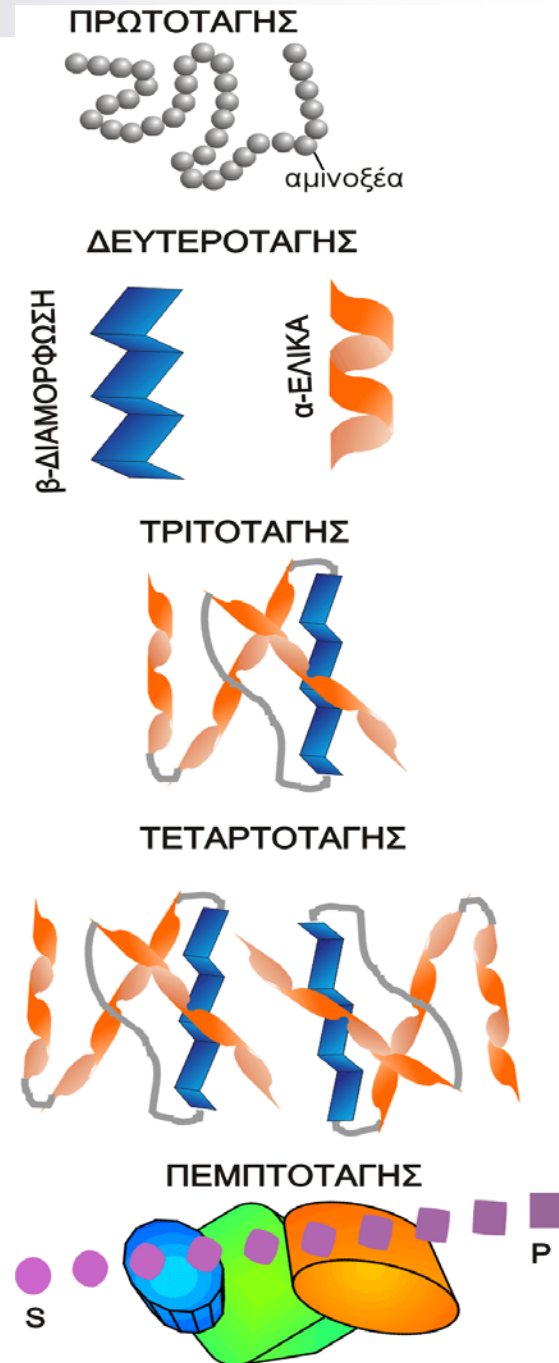
- Κατέχουν κεντρική θέση σε κάθε βιοχημική διεργασία
- Καταλύουν χιλιάδες αντιδράσεις που αποικοδομούν τα μόρια των τροφών (πρόδρομα μόρια – ενέργεια)
- Διατηρούν και μετατρέπουν την ενέργεια μέσα στον οργανισμό
- Καταλύουν τις αντιδράσεις παραγωγής βιομορίων από πρόδρομα μόρια μέσα στον οργανισμό

Πρακτική σημασία:

- Απαραίτητα για την επιβίωση του οργανισμού
- Έλλειψη ή ανεπάρκεια ή υπερλειτουργία συγκεκριμένων ενζύμων => διάφορα νοσήματα
- Μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων => διάγνωση νοσημάτων
- Πολλά φάρμακα εκδηλώνουν τη δράση τους μέσω τροποποίησης της ενζυμικής δραστηριότητας
- Πολλά συστατικά των τροφίμων εκδηλώνουν τη δράση τους μέσω τροποποίησης της ενζυμικής δραστηριότητας

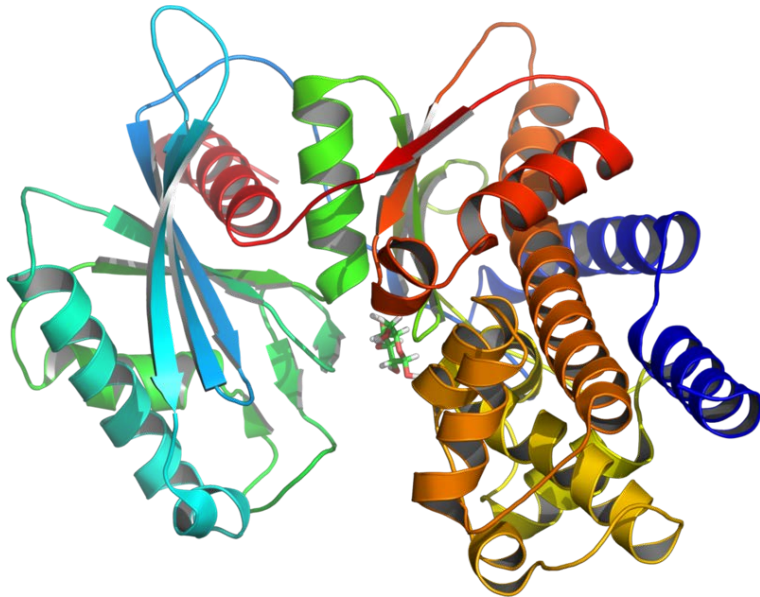
Η φύση των ενζύμων

- Τα περισσότερα ένζυμα είναι πρωτεϊνικής φύσης
- Έχουν βρεθεί όμως και καταλυτικά μόρια που δεν είναι πρωτεϊνικά όπως το καταλυτικό RNA.



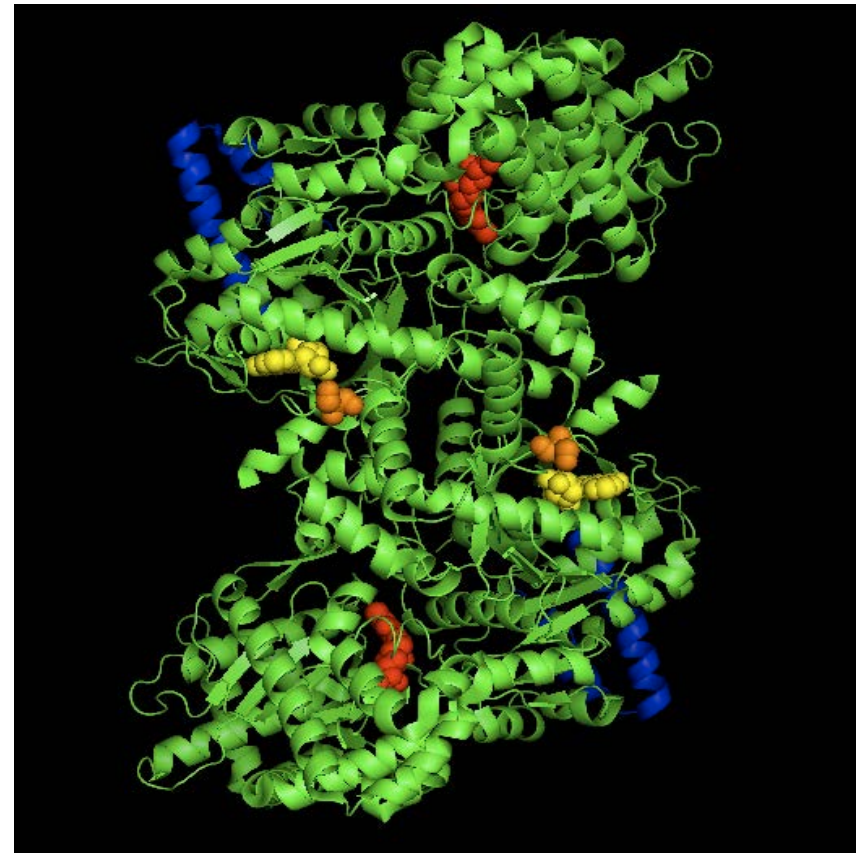
Παραδείγματα.....

Η **γλυκοκινάση (εξοκίναση)** (EC 2.7.1.2) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη.



Μονομερές, 465 αμινοξέα και μοριακό βάρος περίπου 50 kD.

Η **φωσφορυλάση του γλυκογόνου** (EC 2.4.1.1) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την διάσπαση του γλυκογόνου σε γλυκόζη.



Διμερές, 842 αμινοξέα και μοριακό βάρος περίπου 97 kDa

Πως όμως δρουν τα ένζυμα ;

Από τι εξαρτάται ο
ρυθμός (ταχύτητα) της αντίδρασης;

↑ Ενέργεια ενεργοποίησης



↓ Ρυθμός αντίδρασης

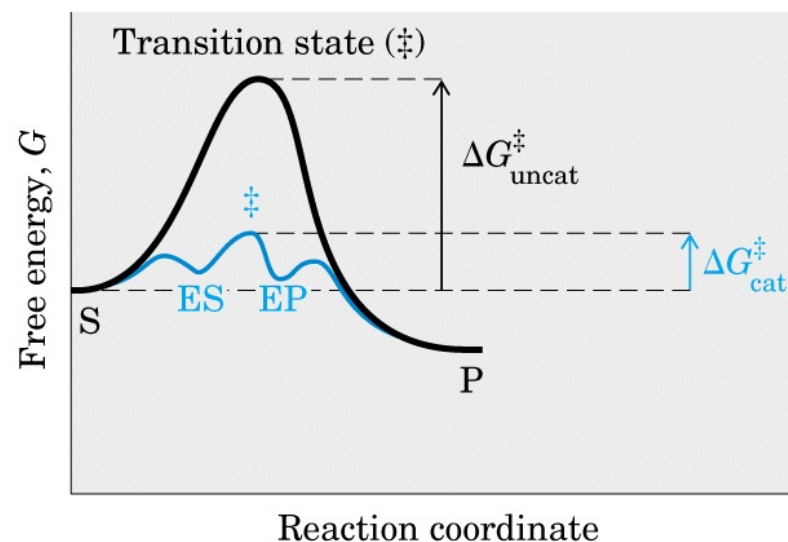
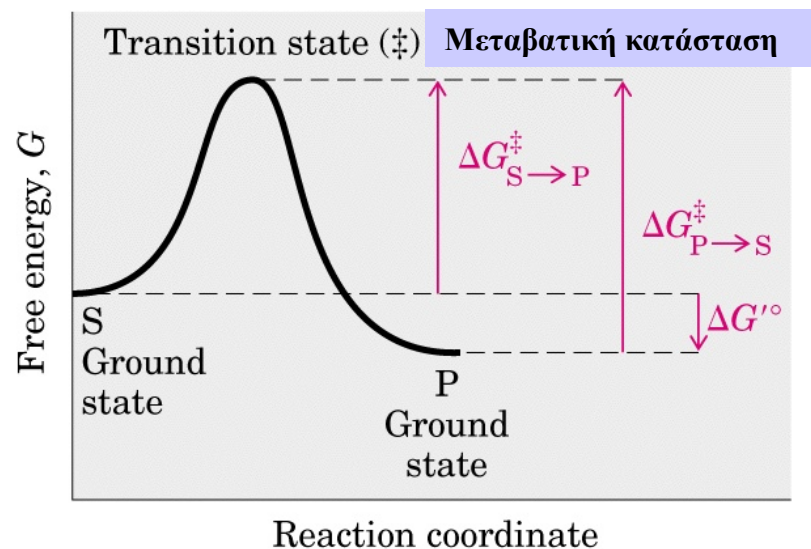
το ένζυμο :

- ⇒ ↓ την ενέργεια ενεργοποίησης
- ⇒ περισσότερα μόρια να ξεπερνούν το ενεργειακό φράγμα
- ⇒ γίνεται πιο γρήγορα η αντίδραση

Σύγκριση με συνθετικούς καταλύτες

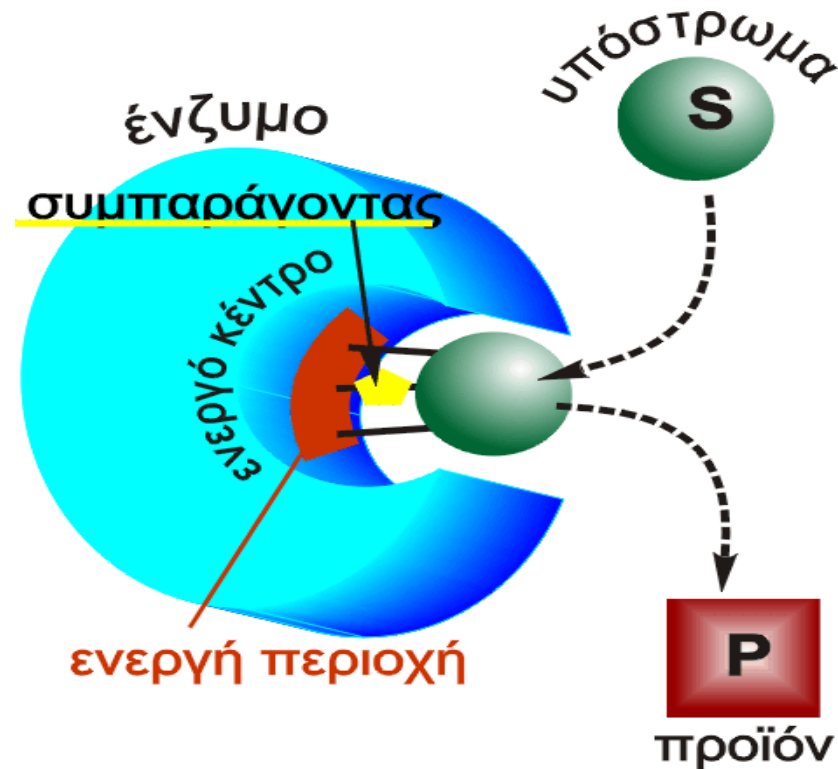
- δρουν σε μικρότερες ποσότητες
- μεγαλύτερη αύξηση ταχύτητας, μέχρι και 10^{12}
- μεγαλύτερη εξειδίκευση
- δρουν σε υδατικά διαλύματα υπό ήπιες συνθήκες

$\Delta G^\ddagger$ = Ενέργεια ενεργοποίησης



ΕΝΖΥΜΑ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

- **Ενεργό κέντρο** : η περιοχή του ενζύμου όπου καταλύεται η αντίδραση
- **Υποστρώματα** : τα αντιδρώντα
- **Ενεργές περιοχές** : τα σημεία που παίρνουν ενεργό μέρος στην αντίδραση
- **Συμπαράγοντες** : μικρά ανόργανα ή οργανικά μόρια απαραίτητα για τη δράση του
- **Συνένζυμο** : τα οργανικά μόρια που χρησιμεύουν σαν συμπαράγοντες
- **Προσθετική ομάδα** : ο συμπαράγοντας που είναι ενωμένος μη αντιστρεπτά



**ολο-ένζυμο =
απο-ένζυμο +
συμπαράγοντας**

Παράδειγμα από την δέσμευση της γλυκόζης στην εξοκινάση

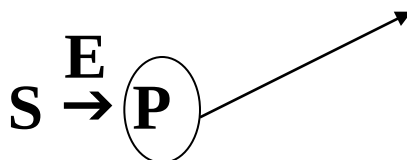
■ <https://www.youtube.com/watch?v=KOyPakHlkaM>

(περίπου 8 λεπτά)

Μέτρηση καταλυτικής δράσης ενζύμων

Ποιοτικά : Η παρουσία των ενζύμων προσδιορίζεται από την παρουσία των συγκεκριμένων αντιδράσεων που καταλύουν.

Ποσοτικά : Με μέτρηση της ταχύτητας της αντίδρασης ($V = [P]/t$)



Μέθοδοι για την ποσοτικού
προσδιορισμού

Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού

- **Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι**

Απορροφούν ακτινοβολία στη περιοχή του ορατού, υπεριώδους

- **Φθορισμομετρικές μέθοδοι**

Φθορίζον συστατικό (φλαβινο-ενώσεις), ↑ ευαισθησία

- **Μανομετρικές μέθοδοι**

Αέρια συστατικά (O_2 /οξειδάσες, CO_2 / καρβοξυλάσες)

- **Μέθοδοι με ηλεκτρόδια**

Απελευθέρωση όξινου προϊόντος

- **Πολωσιμετρικές μέθοδοι**

Οπτικά ισομερή / μέτρηση της περιστροφής του πολωμένου φωτός

- **Χημικές μέθοδοι**

Προσδιορισμός φωσφόρου / φωσφατάσες, πολύ χρόνο

- **Χρωματογραφικές μέθοδοι**

Διαχωρισμός του προϊόντος

- **Χρήση ραδιενεργών ισοτόπων**

Μικρό χρόνο

Παράδειγμα - Φασματοφωτομετρική μέθοδος

Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH, lactate dehydrogenase)

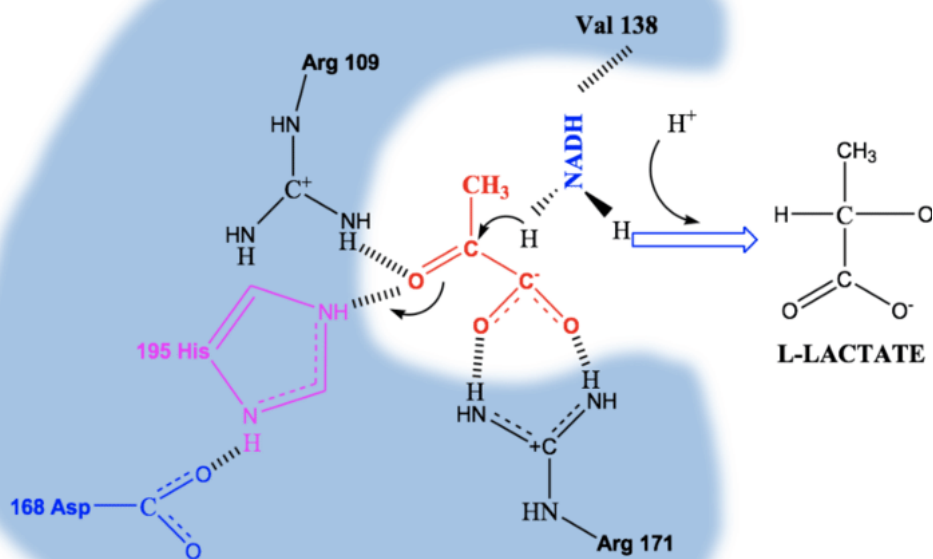
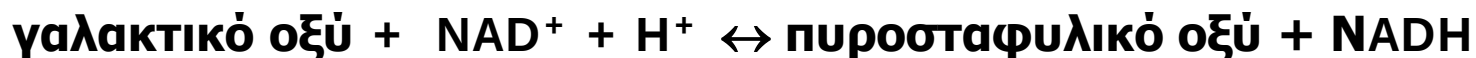
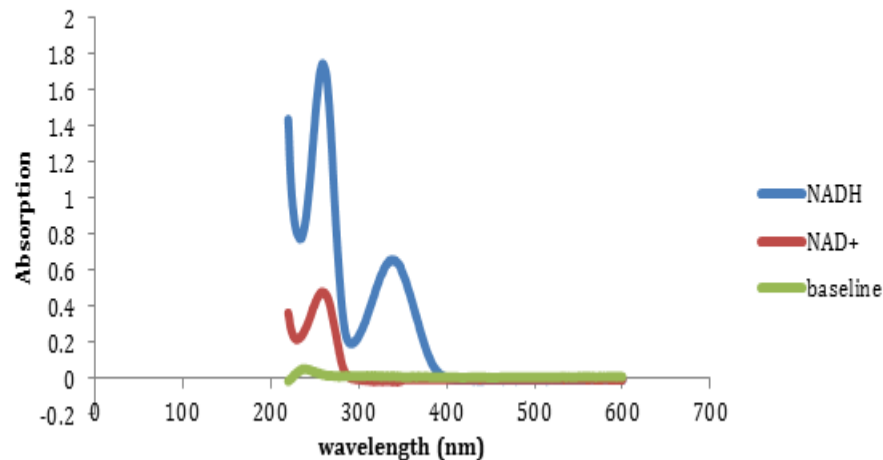
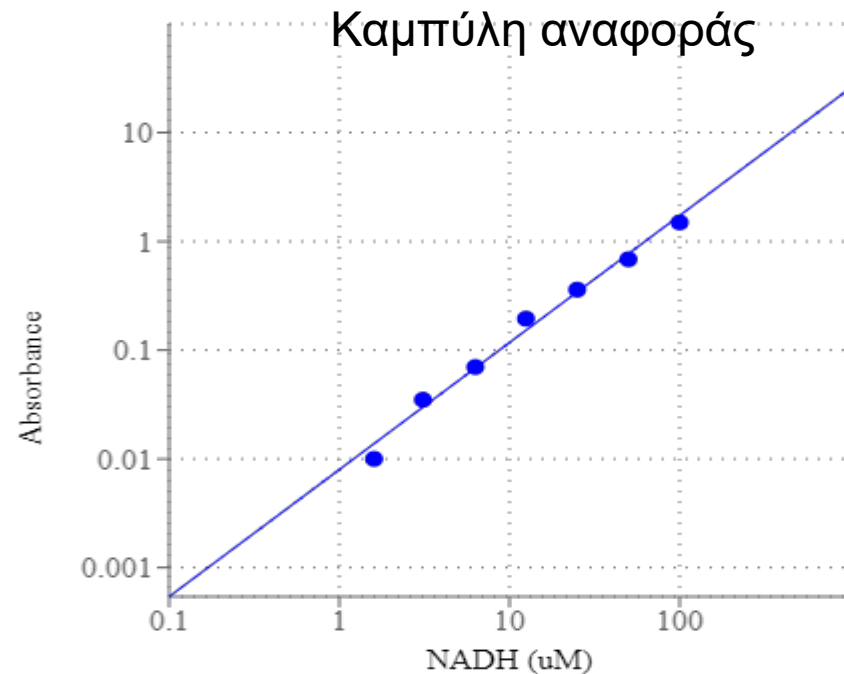
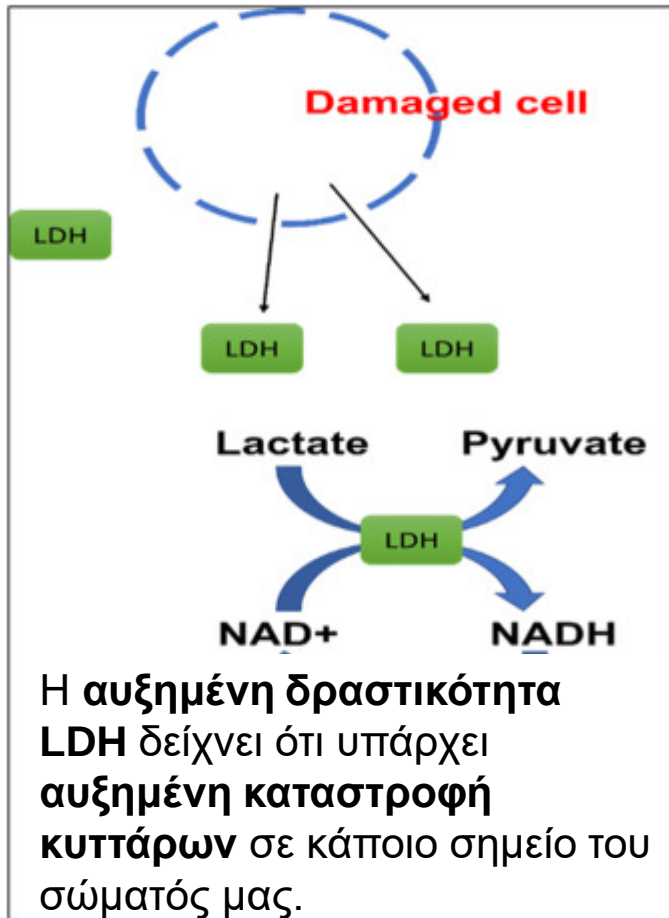


Fig. 1: Absorption of NADH and NAD⁺ at various wavelengths



Παράδειγμα - Φασματοφωτομετρική μέθοδος

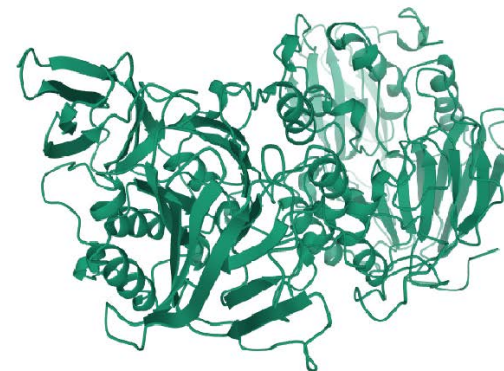
Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH, lactate dehydrogenase)



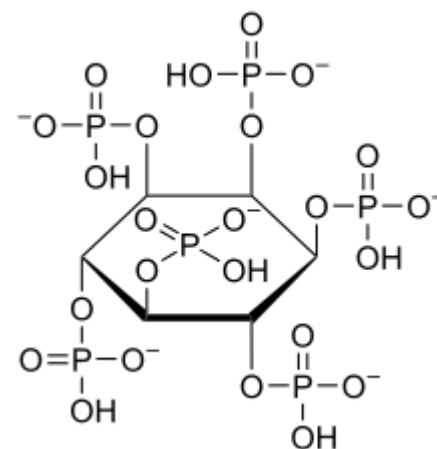
$\uparrow A_{340\text{ nm}} \Rightarrow \uparrow$ Συγκέντρωση NADH (προϊόν)
 $\Rightarrow \uparrow$ Δράση της LDH

Όξινη φωσφατάση από φύτρο σιταριού

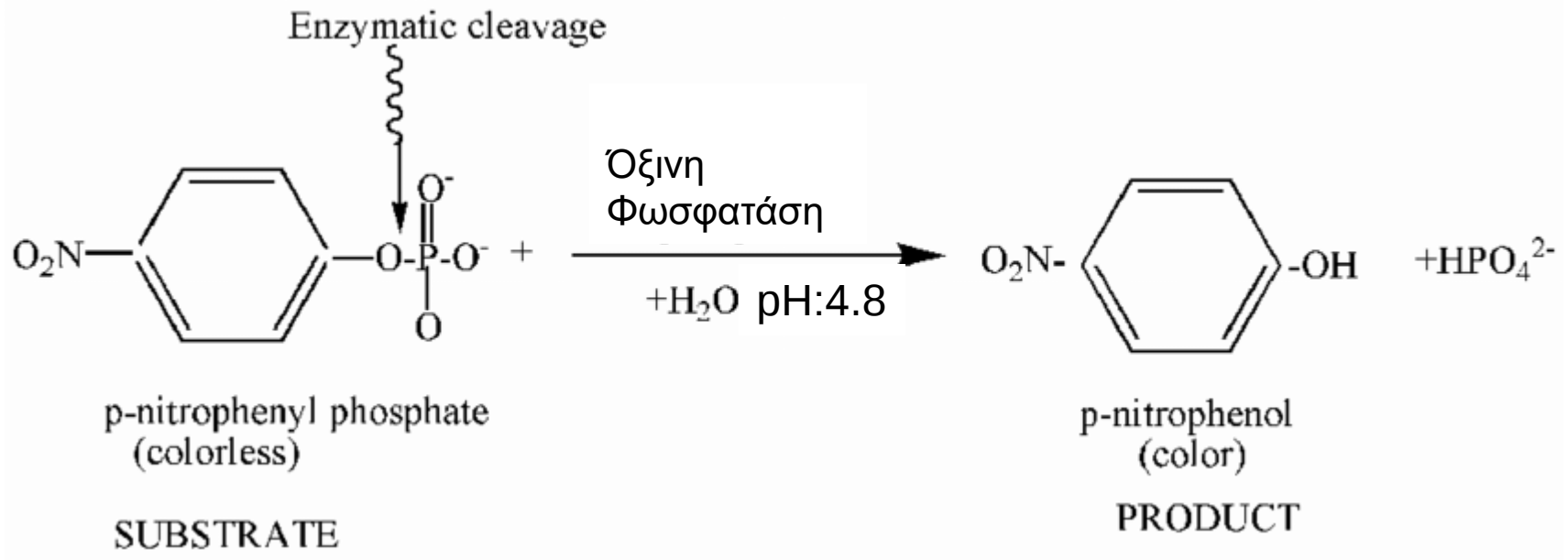
- καταλύει μη ειδικά την υδρόλυση μονοεστέρων του φωσφορικού οξέος για την παραγωγή ανόργανων φωσφορικών.
- συμμετέχει στην ομοιόσταση των ανόργανων φωσφορικών στα φυτά.
- έχει την ικανότητα να υδρολύει φωσφορικές ομάδες από πολλά υποστρώματα και τεχνητά.
- αποτελεί καλό μοντέλο για την μελέτη των ενζύμων.



MB: 58 kD



Όξινη φωσφατάση από φυτό σιταριού



$\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$

Μονάδες ενζυμικής δραστηριότητας

1. Μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας:

1U International unit

το ποσό του ενζύμου που αλλοιώνει 1 μmol υποστρώματος (ή παράγει 1 μmol προϊόντος) σε 1 min σε καθορισμένες συνθήκες

$$U = \mu\text{mol S} / \text{min}$$

2. **Ειδική δραστηριότητα** ή ενεργότητα ή καθαρότητα
(specific activity)

Οι μονάδες ενός ενζύμου ανά mg πρωτεΐνης ενζύμου ή ενζυμικού παρασκευάσματος

$$ΕΔ = U / \text{mg πρωτεΐνης} = \mu\text{mol S} / \text{min} / \text{mg πρωτεΐνης}$$

3. Μοριακή Δραστικότητα (molecular activity)

Οι μονάδες ενός ενζύμου ανά μmol ενζύμου σε βέλτιστες συνθήκες

Αριθμός ανακύκλωσης : (turnover number)

είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που αλλοιώνονται σε 1 min από 1 μόριο ενζύμου

$$M\Delta = U / \mu\text{mol E} = \mu\text{mol E} / \text{min}$$

4. Δραστικότητα καταλυτικού κέντρου

Ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που αλλοιώνονται ανά 1 min από μια προσθετική ομάδα / καταλυτικό κέντρο