**Ćwiczenie 1. BIAŁKA**

 **Oznaczanie ilościowe białka metodą Lowry'ego**

 **Elektroforeza białek surowicy na octanie celulozy**

Wykonanie wg instrukcji

Materiał teoretyczny:

Aminokwasy, peptydy, białka - budowa i właściwości. Struktury białek, budowa a funkcja. Metody oznaczania białek: biuretowa, mikrobiuretowa, spektrofotometryczna, Lowry'ego i Bradforda, metoda Smitha z wykorzystaniem kwasu bicinchoninowego (BCA). Elektroforeza w nośnikach.

Materiały dydaktyczne:

Ćwiczenia z biochemii pod redakcją Leokadii Kłyszejko-Stefanowicz (2005) Rozdział 6 Białka . Metody oznaczania białek [biuretowa/mikrobiuretowa, Lowry’ego, metoda pomiaru absorbancji w nadfiolecie, Bradforda, Metoda Smitha z wykorzystaniem kwasu bicinchoninowego (BCA)].

Ćwiczenia z biochemii pod redakcją Leokadii Kłyszejko-Stefanowicz (2005) Rozdział 5 Elektroforeza w nośnikach.

Biochemia Harpera Część I. Budowa oraz funkcje białek (aminokwasy, peptydy, białka – struktura i funkcja, białka – mioglobina i hemoglobina)

Polecany artykuł: [https://laborant.pl/index.php/struktury-bialek#](https://laborant.pl/index.php/struktury-bialek)

**Ćwiczenie 2. BIAŁKA SUROWICY KRWI.**

 **Analiza frakcji immunoglobulinowej techniką Western blot.**

Wykonanie wg instrukcji

Materiał teoretyczny:

Białka osocza. Przeciwciała budowa ogólna, klasy i ich rola. Otrzymywanie przeciwciał mono- i poliklonalnych. Przeciwciała monoklonalne w terapii celowanej. Metody oznaczania białek: immunoenzymatyczne, radioimmunologiczne. Metoda Western blot.

Materiały dydaktyczne:

Biochemia Harpera – Białka osocza, immunoglobuliny.

Polecany artykuł: [https://laborant.pl/index.php/wybrane-metody-oznaczania-bialek#](https://laborant.pl/index.php/wybrane-metody-oznaczania-bialek) [https://laborant.pl/index.php/bialka-osocza#](https://laborant.pl/index.php/bialka-osocza)

Postepy Hig Med Dosw (online), 2012; 66: 663-673 <https://phmd.pl/resources/html/article/details?id=55167&language=en>

**Ćwiczenie 1. KINETYKA REAKCJI ENZYMATYCZNYCH cz. I**

Wykonanie wg. instrukcji

1. Wykreślanie krzywej wzorcowej do oznaczania produktów hydrolizy sacharozy
2. Wyznaczanie wpływu pH na prędkość początkową (v0) hydrolizy sacharozy przez β-fruktofuranozydazę

Materiał teoretyczny:

Jednostki aktywności enzymów. Szybkość reakcji enzymatycznych. Energia aktywacji. Czynniki wpływające na szybkość reakcji enzymatycznych. Regulacja aktywności enzymów: zymogeny, (ograniczona proteoliza), hamowanie przez sprzężenie zwrotne, efektory allosteryczne, kompleksy wieloenzymowe.

**Ćwiczenie 2. KINETYKA REAKCJI ENZYMATYCZNYCH cz. II**

Wykonanie wg. instrukcji

1. Oznaczenie stałej Michaelisa (KM) dla -fruktofuranozydazy
2. Oznaczanie inhibicji kom petycyjnej -fruktofuranozydazy przez glicerol

Materiał teoretyczny:

Stała Michaelisa. Równanie Michaelisa-Menten, równanie Lineweavera-Burka (wraz z wykresami). Wyznaczanie Km metodą pomiaru szybkości początkowych przy różnych stężeniach substratu. Znaczenie Km w enzymologii. Odwracalne i nieodwracalne hamowanie aktywności enzymów. Hamowanie kompetycyjne, niekompetycyjne.

**Ćwiczenie 1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI AMINOTRANSFERAZ AlAT**

 **I AspAT W SUROWICY**

Wykonanie wg. instrukcji

Materiał teoretyczny:

Enzymy: budowa, nazewnictwo, klasyfikacja, aktywność, jednostki aktywności. AlAT (aminotransferaza alaninowa) i AspAT (aminotransferaza asparaginowa), katalizowane reakcje, znaczenie diagnostyczne. Kofaktory transferaz: ATP, aktywny metyl, aktywny siarczan, CoA, biotyna, H4-folian, pirofosforan tiaminy, fosforan pirydoksalu, UDP, CDP. Kofaktory oksydoreduktaz: NAD+, NADP+, FAD, ubichinon, układ porfirynowy, kwas liponowy. Izoenzymy, znaczenie diagnostyczne.

**Ćwiczenie 2. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI HYDRATAZY FUMARANOWEJ W TKANKACH**

Wykonanie wg instrukcji

Materiał teoretyczny:

Metody izolowania enzymów: wysalanie, chromatografia żelowa, jonowymienna i powinowactwa.

Cykl Krebsa: przebieg, lokalozacja subkomórkowa, regulacja cyklu.

**Ćwiczenie 1. KWASY NUKLEINOWE**

Wykonanie wg. instrukcji

1. Izolowanie DNA metodą fenolową (wykonanie wg. instrukcji)
2. Oznaczanie stężenia DNA, stopnia jego czystości oraz określenie termicznego efektu hiperchromowego (wykonanie wg. instrukcji)

Materiał teoretyczny:

Budowa nukleotydów, kwasów nukleinowych, chromatyny i chromosomu. DNA jako materiał genetyczny. Replikacja DNA, transkrypcja, translacja. Geny i ich struktura. Spektrofotometria kwasów nukleinowych. Denaturacja DNA. Termiczny efekt hiperchromowy DNA. Niektóre właściwości nukleoprotein. Izolowanie DNA.

**Ćwiczenie 2. LIPOPROTEINY OSOCZA**

Wykonanie wg. instrukcji

1. Oznaczanie całkowitych triacylogliceroli
2. Oznaczanie cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu we frakcji lipoprotein o dużej gęstości (HDL)

Materiał teoretyczny:

Lipidy - budowa i klasyfikacja. Lipoproteiny - charakterystyka, transport

i magazynowanie lipidów. Transport cholesterolu za pośrednictwem lipoprotein. Enzymy związane z przemianami lipoprotein. Cholesterol a miażdżyca. Kwasy żółciowe. Leczenie farmakologiczne zaburzeń lipidowych (statyny, fibraty, żywice jonowymienne, inhibitory PCSK9, Ezetymib)

Materiały dodatkowe:

Preparaty farmakologiczne stosowane w leczeniu zaburzeń lipidowych: https://ptkardio.pl/wytyczne/11-wytyczne\_esceas\_dotyczace\_leczenia\_zaburzen\_lipidowych

|  |
| --- |
|  |

**Ćwiczenie 1. OZNACZANIE GLUKOZY**

Wykonanie wg. instrukcji

1. Oznaczanie glukozy

Materiał teoretyczny:

1. Węglowodany o znaczeniu fizjologicznym i klinicznym.
2. Glikoliza: lokalizacja subkomórkowa, przebieg, regulacja, efekt energetyczny. Fosforylacja substratowa i oksydacyjna. Wejście fruktozy i galaktozy do szlaku glikolizy. Rola 2,3-BPG w regulacji transportu tlenu. Efekt Pasteura.
3. Pirogronian i glukozo-6-fosforan jako metabolity węzłowe.
4. Glukoneogeneza: lokalizacja, przebieg, reakcje obejścia, regulacja.
5. Aspekt kliniczny poziomu glukozy.
6. Szlak pentozofosforanowy: lokalizacja, rola szlaku. Znaczenie NADPH.

**Ćwiczenie 2. KRZEPNIĘCIE KRWI**

Wykonanie wg instrukcji

1. Wpływ stężenia jonów wapniowych i jonów wodorowych na szybkość powstawania skrzepu rekalcynowego (wykonanie wg. instrukcji)
2. Wykreślanie krzywych polimeryzacji fibryny w zależności od stężenia fibrynogenu (wykonanie wg. instrukcji)

Materiał teoretyczny:

* Osoczowe czynniki krzepnięcia krwi, rodzaje, właściwości. Rola jonów wapnia i witaminy K. Wewnątrz- i zewnątrzpochodny układ krzepnięcia, czynniki kontaktu.
* Czynnik tkankowy (TF). Fibrynogen - budowa, mechanizm aktywacji. Czynnik XIII - rola. Antytrombina III. Białko C i S.
* Płytki krwi i ich funkcja.
* Fibrynoliza: plazminogen, aktywatory i inhibitory, inhibitory aktywatorów plazminogenu.
* Kliniczny aspekt krzepnięcia krwi. Hemofilia A i B.

**Ćwiczenie 1. OZNACZANIE BILIRUBINY CAŁKOWITEJ**

Wykonanie wg. instrukcji:

1. Oznaczanie bilirubiny całkowitej

Materiał teoretyczny:

Porfiryny, biosynteza hemu, porfirie, katabolizm hemu, barwniki żółciowe, przemiany bilirubiny w wątrobie i jelicie (urobilinogen), hiperbilirubinemie, żółtaczki, znaczenie diagnostyczne oznaczania bilirubiny w surowicy i moczu.